



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Enginyeries Industrial,
Aeroespacial i Audiovisual de Terrassa

MICROENCAPSULACIÓ DE LLEVAT

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

GRAU EN ENGINYERIA QUÍMICA

30 DE JUNY DE 2020

Autora: Mireia Sans Ambrosio
DIRECTOR: MANUEL-JOSÉ LIS ARIAS



Titulació:
Grau en enginyeria química

Alumne (nom i cognoms):
Mireia Sans Ambrosio

Enunciat TFG / TFM:
Microencapsulació de llevat

Director/a del TFG / TFM:
Manuel-José Lis Arias

Convocatòria de lliurament del TFG / TFM:

30 de juny de 2020

Resum

Actualment, la microencapsulació és un camp d'investigació amb molt futur ja que permet conservar en els seus nuclis substàncies sensibles a agents externs. Aquest projecte se centra en desenvolupar un mecanisme per dur a terme l'encapsulació de llevat. També analitzarà com aquesta càpsula i les seves característiques afecta a la fermentació alcohòlica utilitzant com a substrat la D-glucosa.

Agraïments

Voldria agrair al director d'aquest treball, Manuel-José Lis Arias, l'ajuda i guia que m'ha ofert, no només durant el desenvolupament d'aquest projecte, sinó també durant els anys que ha durat el Grau.

Índex

Resum	1
Agraïments	3
Índex	4
Llistat de taules	6
Llistat de figures	8
Llistat d'equacions	12
1. Introducció	13
1.1 Objectius	14
2. Marc teòric	15
2.1 Anàlisi DNS	15
2.1.1 Reactius	17
2.1.1 Espectrofotometria	19
2.2 Microencapsulació	24
2.2.1 Concepte	24
2.2.2 Components de la matriu	25
2.2.3 Procés de microencapsulació	38
2.2.4 Aplicacions de la microencapsulació	48
2.3 Fermentació	53
2.3.1 Llevat	53
2.3.2 Processos de fermentació	56
2.3.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
3. Marc experimental	67
3.1 Anàlisi DNS	67
3.1.1 Procediment	67
3.1.2 Experiments realitzats	69

3.2 Fermentació sense encapsular.....	84
3.2.1 Procediment	84
3.2.2 Resultats.....	87
3.2.3 Discussió de resultats	90
3.3 Encapsulació	92
3.3.1 Encapsulació sense nucli	93
3.3.2 Encapsulació amb nucli de llevat	104
3.4 Fermentació de les càpsules	111
3.4.1 Procediment	111
3.4.2 Resultats.....	113
3.4.3 Discussió de resultats	119
4. Avaluació econòmica	122
4.1 Costos de mà d'obra	122
4.2 Costos de reactius i materials	123
4.3 Costos energètics	124
4.4 Resum de costos	124
5. Avaluació de l'impacte ambiental	125
6. Planificació	127
6.1 Activitats	127
6.2 Diagrama de Gantt	130
6.3 Dedicació per activitats	131
7. Conclusions.....	132
Referències.....	134

Llistat de taules

Taula 1. Llistat de diferents microorganismes i el material que es va utilitzar per encapsular-los [22].	51
Taula 2. Taula de reactius i materials utilitzats per obtenir el reactiu DNS i la recta de calibratge.	67
Taula 3. Reactius consumits per obtenir el DNS i la recta de calibratge.	70
Taula 4. Lectures de l'absorbància de les mostres patrons de glucosa dissoltes.	78
Taula 5. Lectures de l'absorbància de les mostres patrons de glucosa dissoltes simplificant els càlculs de la dissolució.	79
Taula 6. Reactius consumits per obtenir la segona recta de calibratge.	81
Taula 7. Temps d'extracció de les mostres.	85
Taula 8. . Taula de reactius i materials utilitzats per estudiar la fermentació sense encapsulació.	85
Taula 9. Reactius consumits per estudiar la fermentació amb llevat sense encapsular.	86
Taula 10. Lectures de l'absorbància de les mostres i la concentració calculada a partir de la recta de calibratge.	87
Taula 11. Constants de reacció obtingudes.	89
Taula 12. Taula de reactius i materials utilitzats per realitzar l'encapsulació.	93
Taula 13. Quantitats teòriques de reactiu per produir càpsules sense llevat.	93
Taula 14. Taula de reactius i materials utilitzats per realitzar l'encapsulació amb tensioactius.	98
Taula 15. Taula de reactius i materials utilitzats per realitzar l'encapsulació del llevat.	104
Taula 16. Llistat de les dissolucions preparades per encapsular llevat.	105

Taula 17. Temps d'extracció de les mostres pel llevat encapsulat.	112
Taula 18. Taula de reactius i materials utilitzats per estudiar la reacció de la fermentació mitjançant càpsules.....	112
Taula 19. Reactius consumits per estudiar la fermentació amb llevat encapsulat i la concentració de glucosa en dissolució.	113
Taula 20. Lectures de l'absorbància de les mostres i la concentració calculada a partir de la recta de calibratge utilitzant les càpsules 2C.	114
Taula 21. Lectures de l'absorbància de les mostres i la concentració calculada a partir de la recta de calibratge utilitzant les càpsules 3C.	116
Taula 22. Lectures de l'absorbància de les mostres i la concentració calculada a partir de la recta de calibratge utilitzant les càpsules 4C.	118
Taula 23. Taula de costos de la mà d'obra.	122
Taula 24. Taula de costos dels reactius.	123
Taula 25. Taula de costos energètics.....	124
Taula 26. Taula resum de costos del projecte.....	124
Taula 27. Taula de l'impacte ambiental del projecte.	126
Taula 28. Taula de la dedicació per activitat.	131

Llistat de figures

Figura 1. Grup carboxil [6].	16
Figura 2. Reacció del DNS i la glucosa [8].	17
Figura 3. Estructura de la glucosa. La primera correspon a l'estructura cíclica. La segona, a l'acíclica [10].	17
Figura 4. Estructura del DNS [12].	19
Figura 5. Esquema del funcionament de l'espectrofotòmetre [14].	20
Figura 6. Diferents estructures relacionades amb les microcàpsules [15].	25
Figura 7. Estructura de l'agar [17].	26
Figura 8. Diferents famílies d'estructures adoptades pel carragenà [18].	27
Figura 9. Estructura de la pectina [19].	28
Figura 10. Representació de la localització i funció de la pectina en les parets cel·lulars de la planta [20].	30
Figura 11. Evolució de la gelificació de la gelatina [21].	32
Figura 12. Estructures bàsiques de l'alginat [23].	33
Figura 13. Diferents tipologies de blocs formats a partir de les estructures bàsiques [24].	34
Figura 14. Representació de la gelificació de l'alginat a partir de l'addició de l'ió Ca^{2+} . Aquesta estructura es denomina "caixa d'ous" [26].	34
Figura 15. Evolució de la coacervació [30].	42
Figura 16. Esquema representatiu del procés industrial de l'assecat per atomització [27].	43
Figura 17. Imatge del disc giratori durant el procés [27].	46
Figura 18. Esquemes dels diferents models industrials utilitzats pel revestiment [31].	47
Figura 19. Representació de la formació de la càpsula mitjançant Prilling [32].	48
Figura 20. Imatge d'olives encapsulades amb alginat [40].	52

Figura 21. Imatge del llevat “Velluto BMV58” [42].	53
Figura 22. Imatge de les diferents formes comercials del llevat [44].	55
Figura 23. Esquema de l'evolució de la reacció de fermentació alcohòlica.	57
Figura 24. Esquema dels elements mesurats per l'estudi de l'evolució de la fermentació alcohòlica.	59
Figura 25. Evolució de la velocitat de fermentació en diferents casos on s'ha modificat la velocitat d'agitació (rpm) [48].	60
Figura 26. Gràfica de les estimacions teòriques en front de les dades experimentals obtingudes [49].	61
Figura 27. Estructura del tartrat de sodi-potassi [53].	68
Figura 28. Imatge del reactiu DNS preparat al laboratori.	72
Figura 29. Evolució del canvi de color que experimenta la dissolució a mida que la reacció entre el DNS i la glucosa té lloc.	72
Figura 30. Dissolucions patrons utilitzades per fer la recta de calibratge.	73
Figura 31. Gràfica de les lectures obtingudes sense dissoldre les mostres.	74
Figura 32. Imatge que mostra el color original de mostres sense dissoldre (darrere) i el color que tenen un cop són dissoltes (davant).	76
Figura 33. Gràfica de les lectures un cop les mostres de glucosa han sigut dissoltes.	77
Figura 34. Gràfica de les lectures de les dissolucions de llevat.	78
Figura 35. Gràfica de la primera recta de calibratge.	79
Figura 36. Llevat utilitzat al laboratori.	86
Figura 37. Gràfica de l'evolució de la concentració de la glucosa amb el llevat sense encapsular.	88
Figura 38. Gràfica de l'evolució de la velocitat de reacció de la glucosa i el llevat sense encapsular.	88

Figura 39. Gràfica comparativa dels valors teòrics i els valors experimentals per la reacció del llevat sense encapsular i la glucosa.	90
Figura 40. Imatge de l'alginat sòdic utilitzat al laboratori.	92
Figura 41. Primeres càpsules obtingudes utilitzant l'extrusió.	95
Figura 42. Estructura del lauril sulfat [56].	97
Figura 43. Estructura del polietilenglicol [57].	98
Figura 44. Xeringa de diàmetre major [58].	99
Figura 45. Xeringa de diàmetre menor [59].	99
Figura 46. Imatge de les càpsules obtingudes amb un 2% en pes de lauril sulfat (esquerra) i les càpsules sense tensioactius (dreta).	100
Figura 47. Imatge de les càpsules obtingudes amb un 10% en pes de lauril sulfat utilitzant la xeringa gran.	101
Figura 48. Imatge de les càpsules obtingudes amb un 10% en pes de lauril sulfat utilitzant la xeringa petita.	101
Figura 49. Representació de la gelificació de l'alginat en presència de lauril sulfat. L'alginat està representat com a cadenes polimèriques; l'ió calci, pels rombes; i el lauril sulfat, per les rodones amb cua [60].	103
Figura 50. Esquema dels diàmetres de sortida de la xeringa.	106
Figura 51. Imatge del sistema d'extrusió utilitzat al laboratori.	106
Figura 52. Mostra de les càpsules de llevat.	107
Figura 53. Imatge de les diferents mostres obtingudes de càpsules de llevat.	108
Figura 54. Càpsules de llevat produïdes per dur a terme la fermentació.	110
Figura 55. Mostres extretes durant la fermentació mitjançant les càpsules 2C	114
Figura 56. Gràfica que representa l'evolució de la concentració de glucosa per la fermentació de les càpsules 2C.	115
Figura 57. Gràfica de la velocitat de reacció de la càpsula 2C.	115
Figura 58. Gràfica que representa l'evolució de la concentració de glucosa per la fermentació de les càpsules 3C.	117

Figura 59. Gràfica de la velocitat de reacció de la càpsula 3C.	117
Figura 60. Gràfica que representa l'evolució de la concentració de glucosa per la fermentació de les càpsules 4C.	118
Figura 61. Gràfica de la velocitat de reacció de la càpsula 4C.	119
Figura 62. Gràfica de l'evolució de la concentració de la glucosa en els casos 2C, 3C i 4C.	121
Figura 63. Diagrama de Gantt	130
Figura 64. Gràfic de la dedicació de temps per activitat.	131
Figura 65. Gràfica que mostra l'evolució de la concentració del llevat al llarg de la reacció de fermentació per tots els casos estudiats.	133

Llistat d'equacions

Equació 1. Suma d'intensitats.	20
Equació 2. Equació de la transmissió en %.	20
Equació 3. Equació de l'absorbència.	21
Equació 4. Equació de l'absorbència de la llei de Beer.	21
Equació 5. Equació general de la fermentació alcohòlica [41].	56
Equació 6. Equació general simplificada de la fermentació alcohòlica.	58
Equació 7. Equació de la velocitat de fermentació alcohòlica [48]. ..	59
Equació 8. Equació simplificada de la velocitat de reacció de la fermentació alcohòlica.....	61
Equació 9. Equació general de la fermentació làctica [41].	64
Equació 10. Primera recta de calibratge.....	79
Equació 11. Primera recta de calibratge.....	80
Equació 12. Equació de la llei de Beer [13].	80
Equació 13. Segona recta de calibratge.	82
Equació 14. Segona recta de calibratge.	83
Equació 15. Equació de la velocitat de fermentació simplificada [49].	89

1. Introducció

En l'actualitat, les noves investigacions s'han centrat en l'estudi i producció d'aliments funcionals, contenidors de substàncies beneficioses per la salut. Aquesta recerca busca tècniques que permetin la conservació en els aliments d'aquests compostos actius durant el processament i emmagatzematge. Els principals compostos actius utilitzats són vitamines, minerals, aminoàcids, antioxidants i, fins i tot, enzims, cèl·lules i microorganismes probiòtics [1].

Aquestes recerques han portat a la creació de tècniques de microencapsulació que permet crear un producte que millora la seva estabilitat i biodisponibilitat i protegeix aquests compostos actius de factors externs adversos, com la humitat, calor, etc. En conseqüència, la microcàpsula actua com a aïllant que permet emmascarar i protegir sabors i aromes [1].

El llevat és un organisme altament utilitzat durant tota la història de l'ésser humà per a la producció de diferents aliments com el pa, la cervesa, el vi, etc. mitjançant la fermentació.

Microencapsular el llevat té com a objectiu la protecció del llevat davant d'entorns adversos per a la seva supervivència i, a més, regular la reacció de fermentació per adaptar-la a les diferents necessitats dels processos on estigui involucrat. Però també, cal que la microcàpsula no contingui substàncies tòxiques per a l'ésser humà ja que està involucrada en processos de producció d'aliments.

1.1 Objectius

- Selecció d'un mètode òptim per analitzar la concentració de glucosa.
- Producció de microcàpsules amb matriu d'alginat amb nucli de llevat.
- Estudi de l'evolució de la reacció de la fermentació en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*.
- Comparació de l'evolució de la reacció de la fermentació del llevat encapsulat i el llevat sense encapsular. Anàlisi del canvi en l'evolució de la reacció de fermentació del llevat encapsulat respecte el llevat sense encapsular a partir de modificacions en les propietats de les microcàpsules.

2. Marc teòric

2.1 Anàlisi DNS

L'ús i desenvolupament de mètodes analítics és essencial en el seguiment i control del procés de fermentació del sucre en la fermentació. En aquest treball serà clau per determinar la conversió de la reacció i determinar la viabilitat de l'ús de microcàpsules [2].

En la indústria relacionada amb la fermentació, principalment s'utilitza el mètode d'Eynon i Lane per a la determinació de sucres reductors en mels i caldos de fermentació de destil·leries. De fet, és el recomanat per la Comissió Internacional pel Mètodes Uniformes d'Anàlisi de Sucre (ICUMSA en anglès). Aquest mètode, però, té com a inconvenient ser un mètode volumètric on el punt final de la valoració es detecta per canvi de color a partir de l'addició d'un reactiu extern i és un mètode poc sensible. A més, és un mètode poc productiu. Per això, tot i que és exacte per a la determinació de sucres reductors en mels, no és el més adequat per l'estudi que es durà a terme [2].

Un altre mètode diferent a aquest utilitza l'àcid 3,5-dinitrosalicílic (DNS) per calcular la concentració de sucres reductors en diferents materials o dissolucions [2].

Aquest mètode ha sigut modificat al llarg del temps per adaptar-lo a l'anàlisi dels diferents materials. El principal avantatge d'aquest mètode és la seva alta productivitat i sensibilitat ja que és un mètode espectrofotomètric, és a dir, a partir de l'absorció de la llum de les substàncies. En resum, el mètode d'anàlisi DNS per sucres reductors és fàcil, simple i fiable [2].

Per aquests motius, s'ha utilitzat freqüentment en la investigació de carbohidrats i diagnòstics mèdics. El DNS s'ha utilitzat en la determinació de sucre en sang, orina, etc. [3]

Tot i tenir tants avantatges, també té un desavantatge important i és que no és recomanable utilitzar-lo per a la determinació de sucres en mostres amb colors intensos, com mels o caldos de fermentació, ja que poden influir i desviar les lectures efectuades en un mètode espectrofotomètric. És a dir, el color que les substàncies analitzades tenen de per si pot provocar interferències en les lectures espectrofotomètriques [2].

El mètode DNS és una tècnica colorimètrica que consisteix en una reacció redox entre l'àcid 3,5-dinitrosalicíclic (de color groc) i els sucres reductors presents a la mostra analitzada. El poder reductor prové del seu grup carbonil ($C=O$), que es pot oxidar al grup carboxil mitjançant agents oxidants suaus; mentre que el DNS (groc) es redueix a l'àcid 3-amino-5-nitrosalicíclic (de color vermellós-marronós) [4] que es pot quantificar mitjançant espectrofotometria a 540 nm [5], longitud d'ona d'absorbància màxima. La intensitat del color obtingut després de la reacció redox és proporcional a la concentració de sucres. Com major sigui la concentració, major serà la intensitat. Aquesta és analitzada per espectrofotometria [6].

A més, cal que la reacció es dugui a terme en un medi alcalí i a temperatures elevades [6]. La figura 2 mostra la reacció d'oxidació-reducció esmentada.

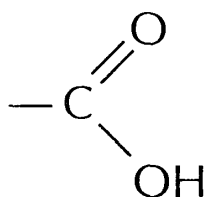


Figura 1. Grup carboxil [6].

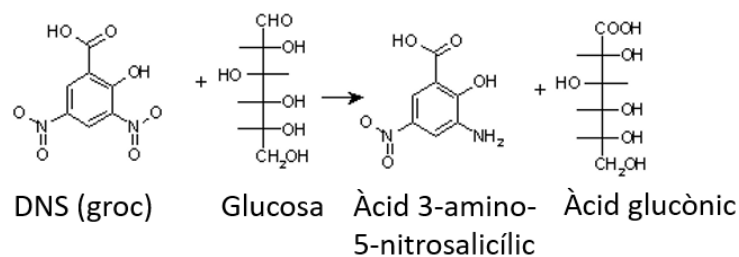


Figura 2. Reacció del DNS i la glucosa [8].

Tot i això, cal tenir en compte que es poden produir altres reaccions durant la prova que pot complicar el procés d'anàlisi [3].

2.1.1. Reactius

2.1.1.1 Glucosa

La glucosa és un grup d'hidrats de carboni coneguts com a sucres simples (monosacàrids, és a dir, té un sucre). També és anomenada dextrosa [9].

La glucosa té la fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ [9], [10]:

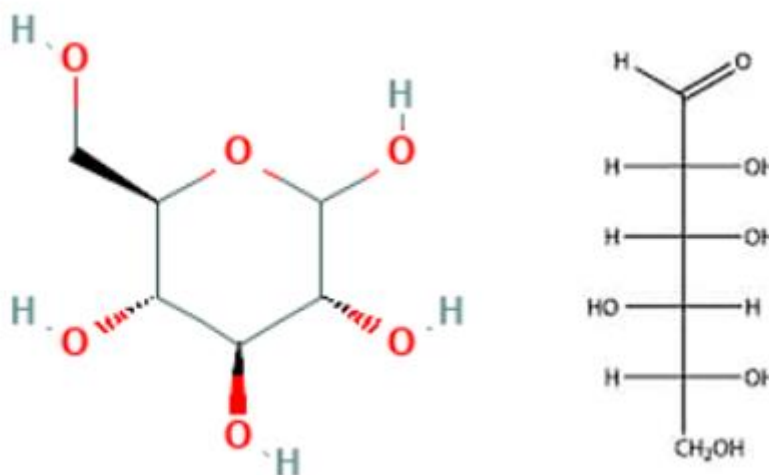


Figura 3. Estructura de la glucosa. La primera correspon a l'estructura cíclica. La segona, a l'acíclica [10].

La molècula de glucosa pot existir en forma de cadena oberta (acíclica) i anell (cíclica). Aquesta última estructura és el resultat d'una reacció intramolecular entre l'àtom de carboni amb el grup de l'aldehid i el grup hidroxil C-5 per formar un hemiacetal intramolecular. En dissolució aquosa, ambdues formes estan en equilibri. En canvi, en pH neutre, predomina la forma cíclica [10].

A més de la glucosa, també existeixen altres monosacàrids com la fructosa, galactosa i ribosa [11].

La glucosa es troba sobretot en fruites i mel i és el principal sucre lliure que circula per la sang dels animals superiors ja que és la principal font d'energia en la funció cel·lular en forma d'hidrat de carboni junt amb el greix [9]. Les molècules de midó, el principal carbohidrat de reserva d'energia de les plantes, està format per milers d'unitats lineals de glucosa [11].

Les persones l'obtenen a través del pa, fruites, verdures i productes làctics [11]. El glicogen és una altra molècula relacionada amb la glucosa present en els éssers vius ja que és el carbohidrat de reserva de la majoria de cèl·lules animals vertebrades i invertebrades, així com les de nombrosos fongs i protozous [9].

2.1.1.2 DNS

L'àcid 3,5-dinitrosalílic (DNS) és un àcid monohidroxibenzoic conformat per l'àcid 2-hidroxibenzoic amb substituents nitro a les posicions 3 i 5. Deriva d'un àcid salicílic [12].

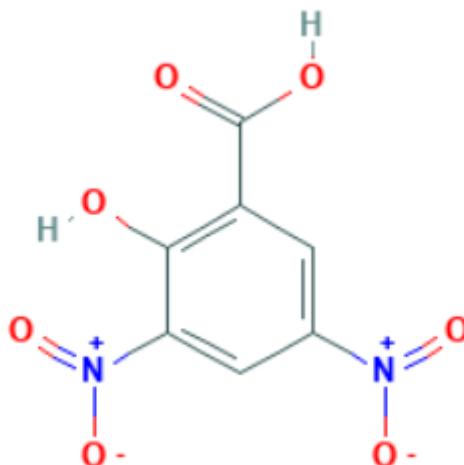


Figura 4. Estructura del DNS [12].

El seu principal ús és en proves colorimètriques ja els grups carbonils lliures ($C = O$) presents en la seva estructura permeten reduir els sucres [12].

2.1.1 Espectrofotometria

L'espectrofotometria UV-visible és una tècnica analítica que permet determinar la concentració d'un compost en solució. Es basa en el fet que les molècules absorbeixen radiacions electromagnètiques en funció de la seva concentració i longitud d'ona de la llum [13].

L'aparell utilitzat per fer aquestes mesures s'anomena espectrofotòmetre. En aquest aparell es pot seleccionar la longitud d'ona de la llum que passa per la solució analitzada i es pot mesurar la quantitat de llum que ha sigut absorbida per diferència amb un blanc. La quantitat de llum absorbida dependrà de la distància a través de la mostra cromòfora que creua la llum i la seva concentració [13].

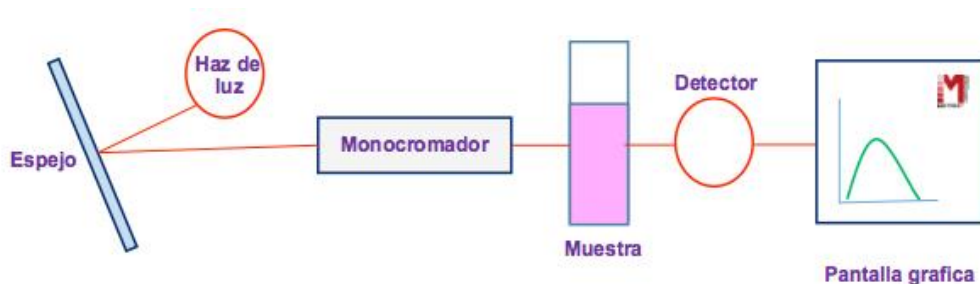


Figura 5. Esquema del funcionament de l'espectrofotòmetre [14].

L'explicació del fenomen que succeeix a l'interior de l'espectrofotòmetre és la següent: quan un raig de llum d'una determinada longitud d'ona de certa intensitat I_0 incideix perpendicularment sobre una dissolució d'un compost químic que absorbeix llum o cromòfor, el compost absorbeix una part de la radiació incident (I_a) i deixarà passar la resta (I_t) [13].

$$I_0 = I_a + I_t$$

Equació 1. Suma d'intensitats.

La transmissió (T) d'una substància en solució és la relació entre la quantitat de llum transmesa que arriba al detector una vegada s'ha travessat la solució i la quantitat de llum inicial expressada en tant per cent [13]:

$$\%T = \frac{I_t}{I_0} \cdot 100$$

Equació 2. Equació de la transmissió en %.

La transmissió permet tenir una mesura física de la relació d'intensitat incident i transmesa abans i després de passar per la mostra. La relació entre la transmissió i la concentració no és lineal, però sí que és logarítmica inversa [13].

Apareix una nova variable anomenada absorbància (A) que es defineix com el logaritme invers de la transmitància:

$$A = \log \frac{1}{T} = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_0}$$

Equació 3. Equació de l'absorbància.

Per tant, quan la intensitat incident i transmesa són iguals, la transmitància és del 100% (ja que la mostra no absorbeix llum a la longitud d'ona utilitzada) i l'absorbància té el valor de 0 [13].

2.1.2.1 Llei de Lambert-Beer

La llei de Lambert-Beer relaciona la concentració d'un cromòfor en solució i l'absorbància de la llum de longitud d'ona fixa (llum monocromàtica):

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Equació 4. Equació de l'absorbància de la llei de Beer.

L'absorbància és el logaritme invers de la transmitància d'una substància dissolta. Per tant, és directament proporcional a la seva concentració (c) i a la distància que recorre la llum (l). També depèn d' ε , el coeficient d'extinció, una constant de proporcionalitat específica de cada substància [13].

L'absorbància és adimensional (no té unitats de mesura). Per tant, les dimensions d' ε depenen de les unitats de la concentració i distància. La distància d'aquestes se sol expressar en centímetres (cm) i en M (molaritat). Per tant, les unitats d' ε solen ser $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ i s'anomena coeficient d'extinció molar. També es poden utilitzar altres unitats, per exemple g/L en la concentració i, llavors, les unitats passaran a ser $L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ i es passa a anomenar coeficient d'extinció específic [13].

Aquesta llei es compleix per a solucions diluïdes. Si els valors de les concentracions analitzades són alts, ϵ variarà en funció de la concentració a causa de fenòmens de dispersió, agregació de molècules, canvis de medi, etc. [13]

2.1.2.2 Corba de calibratge

La corba de calibratge està formada pels punts obtinguts a partir de l'anàlisi de mostres de concentracions i les seves lectures a l'espectrofotòmetre. Aquestes mostres es preparen a partir del mateix compost i amb concentracions conegudes. A més, cal determinar el valor d'absorbància a longitud d'ona màxima que, segons les referències, ha de ser a 540 nm per l'anàlisi amb DNS [13].

Els valors d'absorbància i concentració es representen en un gràfic: a l'eix d'ordenades es situa la lectura de l'absorbància i a l'eix d'abscisses la concentració corresponent [13].

Segons la llei de Beer, la relació entre els diferents punts hauria de ser lineal, és a dir, l'augment de concentració es correspon amb un increment lineal en l'absorbància. A més, cal considerar que les concentracions són massa elevades, la linealitat es perd i s'observa que la línia s'aplanava. En aquest cas, les mesures seran poc fiables. Diluir les mostres analitzades per reduir la concentració de les mostres és un mètode per tenir lectures fiables [13].

Per generar les corbes de calibratge en aquest projecte, s'utilitzen solucions patrons de concentracions conegudes de D-glucosa [5].

2.1.2.3 Punts isosbèstics

Sovint, durant l'anàlisi de diferents espectres fotomètrics d'una substància a diferents concentracions, s'observa que en certs punts (és a dir, a certes longituds d'ona) els espectres es creuen. Aquests punts s'anomenen punts isosbèstics, que significa "igual extinció" en referència al coeficient d'extinció [15].

Aquests punts corresponen a longituds d'ona determinades. El fenomen que té lloc és que, a aquestes longituds, l'absorbància total d'una mostra no canvia encara hi hagi un canvi físic. És a dir, l'absorbància es manté constant encara que es modifiquin algunes variables de la substància com concentració, temperatura, pH, etc. [15]

2.2 Microencapsulació

2.2.1 Concepte

El procés d'encapsulació consisteix en la incorporació d'una matriu polimèrica amb la finalitat de controlar la interacció amb l'exterior del compost actiu. Es descriu, també, com el procés on les partícules o compostos són recobertes homogèniament o heterogèniament en càpsules amb diferents aplicacions. L'encapsulació és el procés d'empaquetament de materials sòlids, líquids o gasos en càpsules que permeten alliberar el seu contingut de manera controlada. És a dir, la microencapsulació és una tècnica que permet obtenir una barrera que endarrerix les reaccions químiques amb el medi que la rodeja de manera que s'augmenta la vida útil del compost actiu, la seva alliberació controlada i la seva manipulació en una forma sòlida [1].

Les micropartícules, microcàpsules o microesferes són el producte del procés de microencapsulació. Aquestes consisteixen en una membrana esfèrica, semipermeable, forta i prima, anomenada fase externa o matriu, que envolta un nucli sòlid o líquid amb un diàmetre d'entre uns pocs microns fins a 1000 μm . El nucli és el compost actiu, també anomenat fase interna [1].

Els hidrocol·loides són els compostos utilitzats per crear la microcàpsula ja que té com a propietats ser innocu, capaç d'absorbir aigua i és de fàcil manipulació [1].

Els tipus de partícules es diferencien per la seva estructura interna i morfologia, és a dir, per la distribució del compost actiu. L'obtenció de cada una de les estructures depèn de les propietats físico químiques del compost actiu i de la matriu i, també, de la tècnica d'encapsulació

utilitzada. Les microesferes tenen el principi actiu dispers a la matriu en forma de molècules o partícules. Les microcàpsules, en canvi, tenen un sol nucli sòlid o líquid recobert per una pel·lícula de material. Aquesta pel·lícula pot estar composta per una membrana simple, capes múltiples o nuclis múltiples. A més, poden tenir forma esfèrica o irregular [1].



Figura 6. Diferents estructures relacionades amb les microcàpsules [15].

2.2.2 Components de la matriu

Els hidrocol·loides són els components més utilitzats com a matriu degut a la seva capacitat per absorbir aigua, innocuïtat i fàcil manipulació [16].

Existeixen molts tipus d'hidrocol·loides gelificants industrials importants d'orígens diversos. A continuació, es detallaran els més importants a partir de les descripcions i dades que Burey et al. [16] van realitzar i aportar al seu article.

2.2.2.1 Agar

L'agar és una barreja complexa de polisacàrids. Aquests comparteixen la mateixa estructura vertebral, anomenada agarosa, però tenen una gran varietat de grups carregats. El seu ús principal en la indústria és com a gel en la preparació de medis sòlids de cultiu per a microorganismes [16].

L'agarosa consta de cadenes de galactosa β -1,3-lligada-D-galactosa i 3,6-anhidro-L-galactosa enllaçada amb α -1,4 i és essencialment lliure de sulfats. El mínim dels pesos moleculars de l'agarosa són normalment de 100.000 Daltons [16].

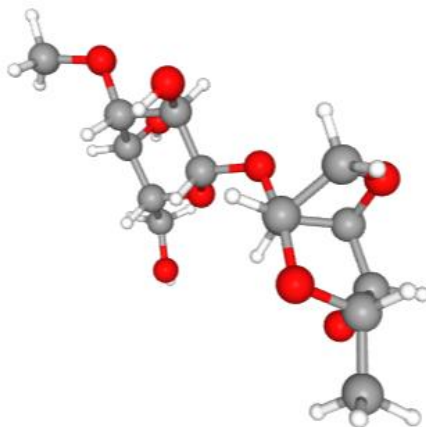


Figura 7. Estructura de l'agar [17]

Els gels d'agar s'aconsegueixen mitjançant un mecanisme de fixació en fred. La gelificació es produeix quan es formen hèlixs dobles a partir de dues cadenes de polímers simples. Els ponts anhidro i la flexibilitat conformational limitada al voltant dels enllaços glicosídics limiten la molècula i promouen la formació d'una hèlix regular; la posterior agregació d'hèlixs produeix la formació del gel. Factors com la rigidesa de residus de 3,6-anhidro-L-galactosa promouen la seva gelificació [16].

Els gels d'agar solen ser rígids, trencadissos, tenen formes ben definides i amb diferents punts de fusió i fixació. Es poden formar en solucions diluïdes amb concentracions inferiors a l'1% en pes [16].

L'agar es troba principalment en les espècies d'algues marines *Gelidium* i *Gracilaria*. Es va produir i desenvolupar per primer cop al Japó [16].

2.2.2.2 Carragenà

El carragenà és un polisacàrid sulfat aniònic, amb un elevat pes molecular. Està compost per unitats alternatives de β -d-galactosa i 3,6-anhidro- α -d-galactosa, unides per unions glicòsides α - (1,3) i β - (1,4) que tenen un contingut en sulfat d'èster del 15–40% (en pes). Tot i això, no té una estructura molecular única, sinó que consta de famílies d'estructures [16].

Els tres tipus de carragenans disponibles comercialment són coneguts com κ , ι , i λ . No es distribueixen comercialment ni existeixen al món natural de forma aïllada. De fet, els carragenans comercials són barreges d'aquest tipus, amb el predomini d'un d'ells, o bé són molècules híbrides que contenen components estructurals de més d'un tipus [16].

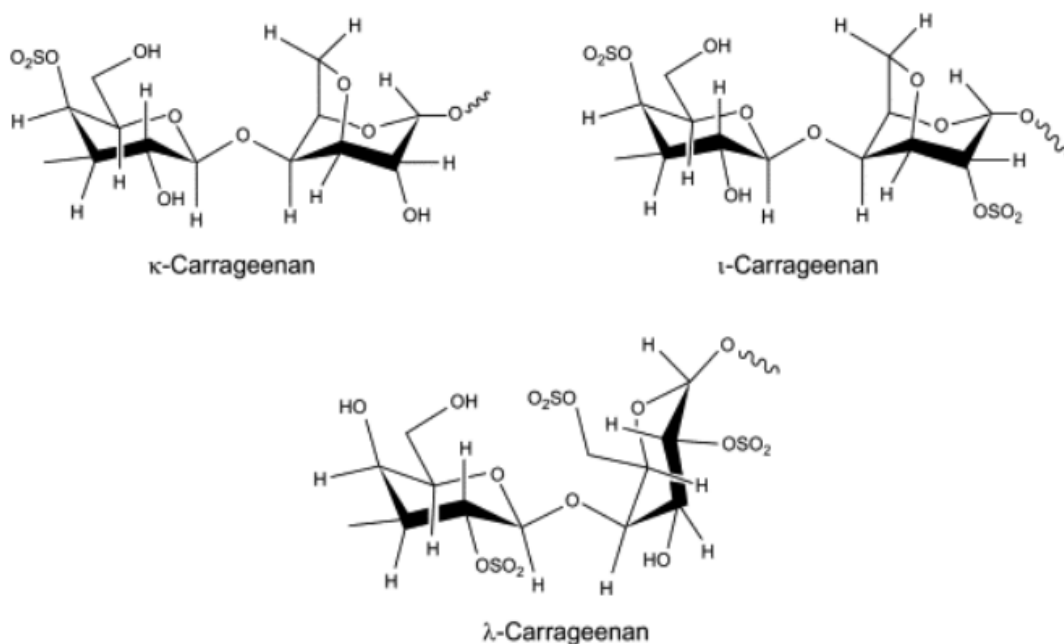


Figura 8. Diferents famílies d'estructures adoptades pel carragenà [18]

Els tipus de gels fet a partir de carragenans tenen textures molt diferents, degut a les diferències en els seus grups sulfatats i els ponts anhidro dels diferents tipus d'estructures [16].

Les sals de sodi de tots tres són solubles en aigua freda i no es gelen fins que no s'introdueixen al sistema suficients ions de potassi ni de calci. Les concentracions típiques per dur a terme la gelificació són entre el 0,5 i el 3% [16].

La font principal dels carragenans són les algues vermelles de la classe *Rhodophyceae*, on la seva funció principal és el manteniment de l'estructura com a component principal de la paret cel·lular [16].

2.2.2.3 Pectina

La pectina és un heterosacàrid derivat de la paret cel·lular de les plantes [16].

Les pectines tenen una gran varietat d'estructures on varien les seves longituds, complexitat i ordre de les unitats monosacàrids. Tot i això, hi ha una estructura característica de la pectina, que és una cadena lineal d'àcid D-galacturònic unit alfa (1-4) [16].

L'estructura química bàsica consisteix en una cadena d'unitats d'àcid galacturònic amb pesos moleculars entre, aproximadament, 110.000 i 150.000 [16].

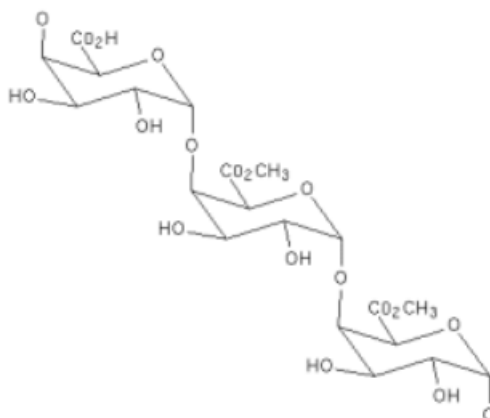


Figura 9. Estructura de la pectina [19].

Aproximadament, quan encara es troba a la fruita, hi ha un grup d'àcid lliure entremig de tres o quatre èsters metílics de l'àcid galacturònic. I això correspon a un grau d'esterificació (DE) del 70-80%. L'esterificació es pot controlar durant el procés d'extracció de manera que la DE del producte final de pectina pot oscil·lar entre 0-75%. És important controlar la DE i la disposició d'èsters metílics en l'estructura de la molècula de pectina ja que controlen el seu comportament com a agent gelificant o agent estabilitzador de proteïnes [16].

La pectina es divideix en dos grups en funció del DE que té: una DE inferior al 50% s'anomena pectina de baix èster (LE). Aquestes, generalment, generen el gel mitjançant un mecanisme de gelificació ionotròpic amb ions divalents. El model de gelificació per les LE que s'ha suggerit és el de "caixa d'ou", similar a l'estructura de xarxa formada en gels alginats. La base de la xarxa és la de les cadenes de pectina reticulades pels ions de calci mitjançant la quelació dels grups carboxil i hidroxil [16].

La pectina és un polímer estructural. Es troba, pràcticament, a totes les plantes terrestres ja que es considera que és l' "adhesiu" intercel·lular que ajuda a reforçar l'estructura de les parets cel·lulars de la planta [16].

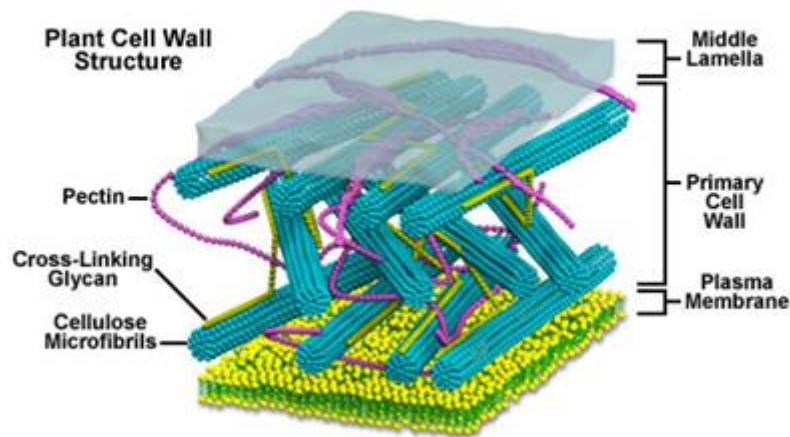


Figura 10. Representació de la localització i funció de la pectina en les parets cel·lulars de la planta [20].

La pectina pot tenir forma de sal àcida o metàl·lica. És soluble en aigua en totes les formes. De forma similar a l'alginat, les propietats del gel de pectina LE es veuen afectades per la concentració d'hidrocol·loides, la concentració de ions i el mètode de preparació [16].

Per extreure la pectina per a usos comercials, s'utilitzen pells de cítrics, la polpa seca de la poma o residus de remolatxa de sucre [16].

2.2.2.4 Gelatina

La gelatina es diferencia dels hidrocol·loides comentats anteriorment, ja que es deriva d'una proteïna animal, col·lagen, mitjançant àcid controlat o hidròlisi alcalina. El col·lagen pot provenir de pell, ossos o qualsevol altre material col·lagen. L'utilitzat habitualment és d'origen boví, porcí o del peix [16].

Les seves propietats depenen de la font i característiques d'aquesta, com l'edat i el tipus de col·lagen [16].

La gelatina no és un compost que es trobi aïllat o independent d'altres substàncies. En general, el compost d'una gelatina típica consisteix en un 14% d'humitat, un 84% de proteïna i un 2% de cendra [16].

La proteïna consisteix en una barreja d'aminoàcids. Els que es troben en majors quantitats són la glicina, prolina i hidroxiprolina. De fet, les molècules de gelatina estan constituïdes per estructures de seqüències repetitives de triplets de glicina-X-Y esteses sobre grans regions de la cadena del polímer, on X i Y són freqüentment aminoàcids de la prolina i la hidroxiprolina. Aquesta regularitat és necessària per formar la triple estructura helicoidal en gelatina i altres proteïnes de la família de col·lagen. En la capacitat de formar gels de la gelatina, els segments triple helicoidal constitueixen la base per a la formació de xarxa tridimensional i de reticulació [16].

Cal destacar que la gelatina forma un gel termoreversible mitjançant un mecanisme de fixació en fred en dissolvents aquosos. És a dir, per sobre de 40 °C, la gelatina en solució es comporta com un polímer sintètic típic amb macromolècules individuals, on cadascuna té configuracions aleatòries amb pesos moleculars típics constituint cadenes polipèptides simples, anomenades cadenes α . Durant la gelificació, s'enreden aquestes cadenes aleatòries formant bobines. Al refredar-se, aquestes bobines experimenten una transició entre bobina i hèlix, i donen lloc a una gelificació [16].

Normalment, les temperatures de gelificació són més elevades que la temperatura ambient. Això comporta que la seva cinètica sigui relativament lenta [16].

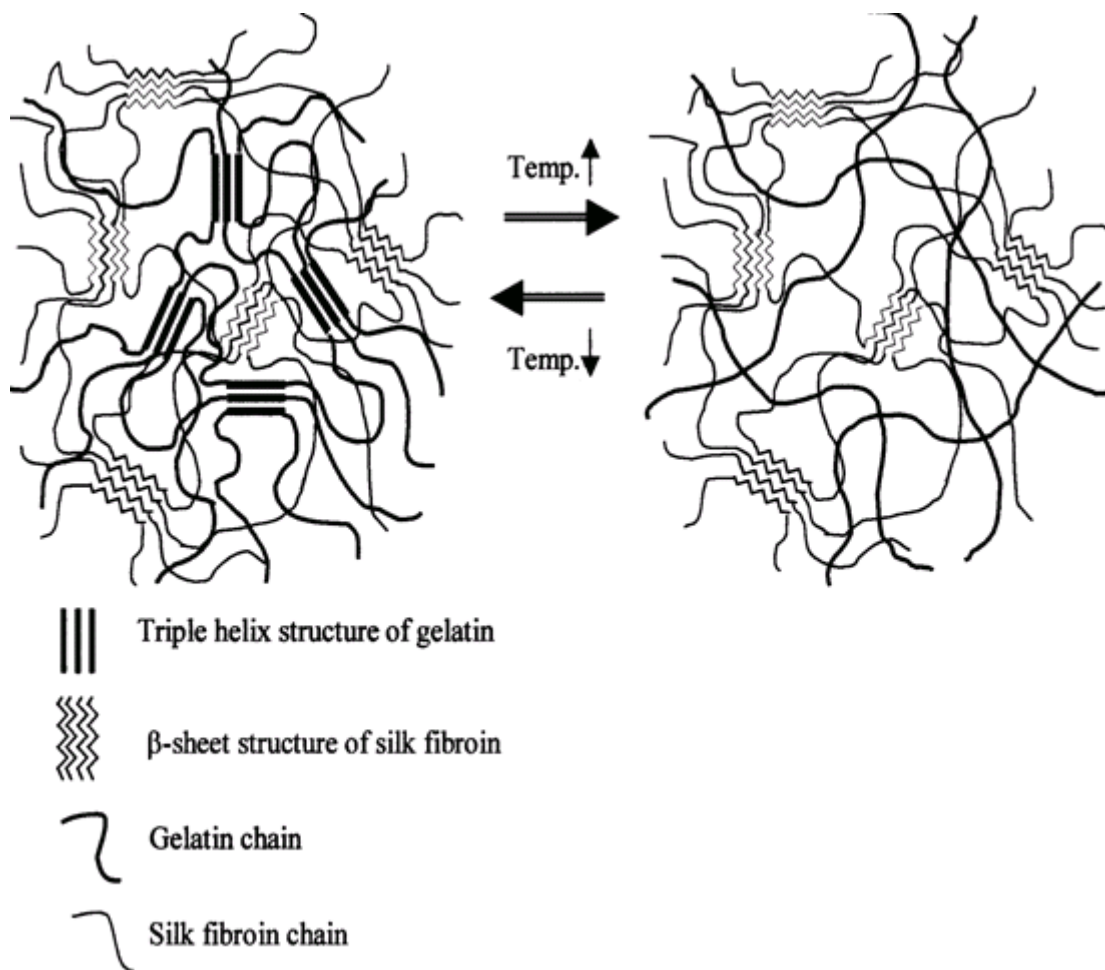


Figura 11. Evolució de la gelificació de la gelatina [21].

Els gels de gelatina necessiten, normalment, concentracions més elevades per formar-se que l'agar, alginat, carragenà o pectina. Les concentracions més utilitzades en productes alimentaris són d'1–5% (% en pes) [16].

Les propietats del gel depenen de la concentració de gelatina, la velocitat de refrigeració durant la gelificació i el pH [16].

2.2.2.5 Alginat de sodi

L'alginat és un polisacàrid lineal poliònic i hidrofílic [1].

L'alginat és un hidrocol·loide amb propietats com ser gelificant, estabilitzant o espessants. Per això, és de gran interès per a la indústria alimentària. Prové, principalment, d'algues marines [1].

En contrast amb la resta dels polisacàrids explicats anteriorment, forma gels independentment de la temperatura, cosa que el fa atractiu per a l'elaboració de cremes, formatges, salses, etc. Tot i això, l'exposició perllongada a tractaments de calor i variacions extremes del pH provoca una degradació en el polímer i, en conseqüència, es produeixen pèrdues en les propietats del gel [1].

La seva forma comercial és una pols marró, blanca o groguenca, sense gust i inodora i es ven com a additiu alimentari [22].

L'alginat està format per dos monòmers en la seva estructura: l'àcid α -L-gulurònic (G) i l'àcid β -D-manurònic (M). Aquests es reparteixen en diferents seccions o blocs constituint els tipus G-blocs (-GGG-), M-blocs (-MMM-) o blocs on M i G s'alternen (-MGMG-) [1].

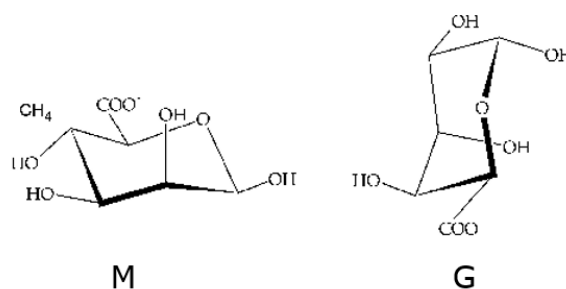


Figura 12. Estructures bàsiques de l'alginat [23].

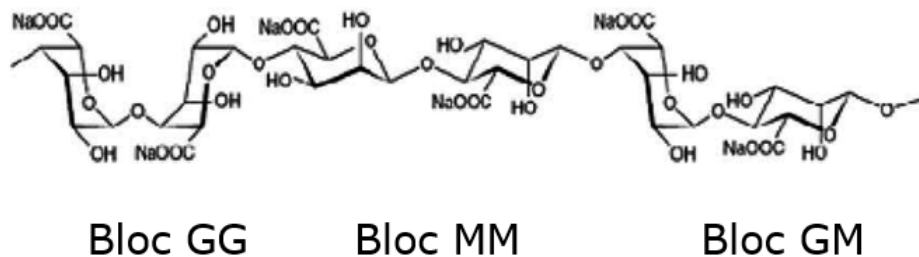


Figura 13. Diferents tipologies de blocs formats a partir de les estructures bàsiques [24].

El contingut de grups G, la distribució dels seus monòmers en el polímer, la seva càrrega i volum dels grups carboxílics afecta les característiques del gel d'alginat que formarà com, per exemple, la seva flexibilitat o rigidesa. Si l'alginat, en la seva estructura polimèrica, té major quantitat de G-blocs, gelificarà en un gel fort i fràgil. En canvi, una presència de major de M-blocs i, per tant, reducció de la presència de G-blocs, comportarà que el gel obtingut sigui suau i elàstic [16].

2.2.2.5.1 Gelificació de l'alginat de sodi

Com s'ha explicat anteriorment, el gel d'alginat que s'obtingui dependrà de la proporció de G-blocs. Això és a causa que el procés de gelificació es duu a terme en presència de cations multivalents (excepte el magnesi) als blocs G. Concretament, l'ió calci és el més catió utilitzat per la indústria alimentària [25].

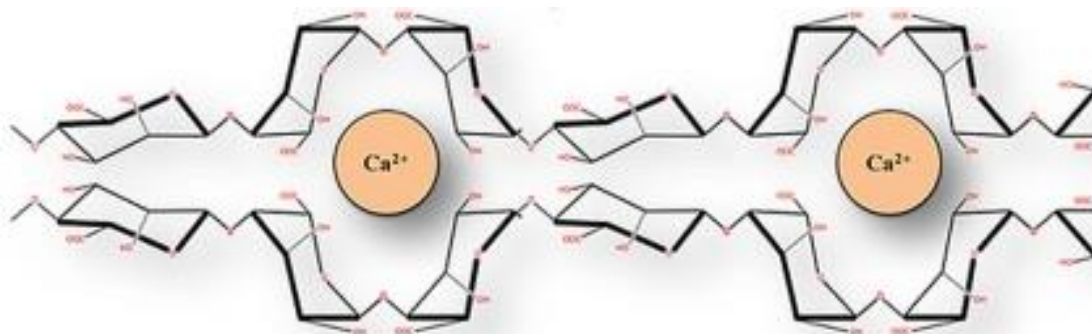


Figura 14. Representació de la gelificació de l'alginat a partir de l'addició de l'ió Ca^{2+} . Aquesta estructura es denomina "caixa d'ous" [26].

El procés de gelificació s'inicia a partir d'una solució de sal d'alginat i una font de calci externa o interna en un medi iònic que provoca la pèrdua de l'ió monovalent al qual està lligat inicialment l'alginat, generalment el sodi [1].

Es produeix una zona d'unió entre un Bloc G iònic que s'enllaça a un altre bloc G iònic contingut en una altra molècula d'alginat a través de l'ió calci. D'aquesta manera apareix una zona d'unió entre blocs G de diferents molècules d'alginat "lligades" pels cations multivalents [1].

Això provoca un nou ordenament estructural en el espai resultant en un material sòlid amb les característiques d'un gel [1].

El grau de gelificació depèn de la hidratació de l'alginat, la concentració de l'ió calci i el contingut dels G-blocs [1].

La gelificació depèn de la capacitat d'introduir l'ió vinculant a l'alginat. També s'ha observat que la cinètica de gelificació i les propietats del gel poden dependre del tipus de contraió, és a dir, l'ió monovalent de la sal d'alginat [1].

Els mecanismes de gelificació iònica s'han dut a terme fonamentalment per dos processos: la gelificació externa i la gelificació interna. La principal diferència entre el mecanisme de gelificació externa i interna és la cinètica del procés i el mètode d'aportació dels cations multivalents. [1]

Per controlar el procés, és necessari determinar la concentració de calci i composició del polímer en el cas de la gelificació externa; en canvi, per al procés de gelificació interna s'ha d'estudiar la solubilitat i concentració de la sal de calci, concentració de l'agent segrestant i de l'àcid [22].

a) Gelificació iònica externa

La gelificació iònica externa es produeix quan la difusió de l'ió calci es produeix des d'una font externa que envolta l'hidrocol·loide. El procés s'inicia a la interfase i avança cap a l'interior a mida que la superfície es satura dels cations multivalents. L'ió sodi, el catió monovalent més comú de l'alginat provinent de la sal, és desplaçat pel catió solubilitzat en aigua [1].

La principal tècnica de microencapsulació que utilitza aquest tipus de gelificació és la tècnica d'extrusió [22].

b) Gelificació iònica interna

La gelificació iònica interna es produeix duent a terme un alliberament controlat del catió multivalent des d'una font interna de sal d'aquest ió insoluble o parcialment soluble dispersa en la solució d'alginat. L'alliberament del nou ió pot donar-se de dues formes diferents. En el primer cas, si es té una sal insoluble a pH neutre però soluble a pH àcid, mitjançant d'addició d'un àcid orgànic, permetrà l'acidificació del medi aconseguint solubilitzar la sal amb el catió. Si s'utilitza aquest mètode amb l'ió càlcic, les sals de calci més utilitzades són el carbonat de calci i el fosfat tricàlcic. Per l'acidificació del medi s'utilitzen àcids orgànics com l'acètic, adípic i el glucono delta-lactona. En el segon cas, si la sal de calci és parcialment soluble, el procés consisteix en l'addició d'un agent segrestant com el fosfat, sulfat o citrat de sodi, a la barreja d'alginat i sal de calci. Aquest segrestant s'enllaça amb el calci lliure retardant així el procés de gelificació. El sulfat de sodi és el més utilitzat gràcies al seu baix cost i la seva solubilitat ideal per aquest mètode [1].

La principal tècnica de microencapsulació que utilitza aquest procés és la tècnica d'emulsió que s'ha aplicat amb èxit en el procés de microencapsulació de probiòtics [22].

2.2.2.5.2 Sistemes mixtos

Com s'ha explicat anteriorment, l'alginat de sodi és un polielectròlit. Això li ofereix la capacitat d'interaccionar amb altres molècules i formar sistemes mixtos utilitzant la interacció electrostàtica. La producció d'aquests sistemes ha sigut un mètode comunament utilitzant per millorar les propietats estructurals dels gels [22].

La interacció electrostàtica té lloc entre biopolímers carregats amb càrregues oposades. Generalment, els sistemes de biopolímers utilitzats inclouen una molècula de proteïna com a polielectròlit positiu i una molècula de polisacàrid com a polielectròlit negatiu [22].

Hi ha una tècnica anomenada "capa per capa" que s'aplica a l'àrea de microencapsulació per a la producció de multicapa de polielectròlits. Consisteix en l'adsorció consecutiva de capes alternades de polielectròlit carregat positivament i negativament sobre la partícula de plantilla [22].

Els polímers més utilitzats per formar aquestes multicapes amb l'alginat són el quitosà, el poliaminoàcid (per exemple, la polisina) i les proteïnes del sèrum de la llet. La combinació d'aquests compostos ha conduït a la formació de càpsules més estables [22].

2.2.3 Procés de microencapsulació

La microencapsulació pot realitzar-se per diferents tècniques o tecnologies.

La selecció d'aquesta tècnica s'ha de determinar en funció de les propietats fisicoquímiques del material de suport i l'aplicació final de la microcàpsula per assegurar la biodisponibilitat dels compostos, la seva funcionalitat i la incorporació en els aliments [22].

2.2.3.1 Etapes de la microencapsulació

En general, el procés de microencapsulació consta de 5 etapes [27]:

1. Preparació del material encapsulant o matriu: es prepara la solució del compost, hidrocol·loide, que s'utilitzarà a la matriu. Aquesta etapa depèn de la tecnologia que es vulgui utilitzar [27].
2. Preparació i incorporació de nucli: es prepara el material, solució, etc. del material que conformarà el principi actiu encapsulat [27].
3. Dispersió i homogeneïtzació del nucli: aquesta etapa també depèn de la tecnologia que es vulgui utilitzar. Aquí, la solució es prepararà addicionant substàncies com tensioactius, emulsionants, etc. [27]
4. Formació de partícules: les micropartícules prenen forma [27].
5. Enduriment o estabilització: es produeix l'estabilització de les microcàpsules que s'ha començat a formar a l'etapa anterior. En

acabar aquesta etapa, s'obtindrà el producte final que consistirà en microcàpsules estables amb un nucli format pel principi actiu [27].

2.2.3.2 Tecnologies de microencapsulació

Les tecnologies de microencapsulació es divideix en 5 grans grups: degoteig o extrusió, assecat per atomització, *prilling*, revestiment i emulsió. Dins de cada un d'aquest grups, hi ha diferents mètodes i tècniques de microencapsulació [28].

En el cas de l'ús de l'alginat com a matriu, les principals tècniques de microencapsulació en aplicacions alimentàries industrials són l'emulsió, l'assecat per atomització i l'extrusió o degoteig [1].

Com s'ha dit anteriorment, per seleccionar el mètode de microencapsulació adequat s'han de tenir en compte les propietats del nucli (líquid, sòlid, volàtil), els requisits en funció de l'ús que es vulgui donar a la microcàpsula i el material encapsulant escollit per a la matriu [27].

2.2.3.2.1 Emulsió

La tècnica d'encapsulació en emulsió és el procés on es produeix la dispersió d'un líquid en un altre líquid immiscible. La fase dispersa està composta pel material de la matriu que inclou el component a encapsular [1].

Per millorar la formació i estabilitat de l'emulsió i gestionar la distribució de la mida de les gotes, es fa una addició d'un tensioactiu [1].

Aquesta tecnologia pot utilitzar el mecanisme de gelificació externa o interna. En el primer cas, la gelificació externa en aquesta tecnologia consisteix en la dispersió de la dissolució d'alginat en una fase contínua no aquosa (com oli). A continuació, es produeix l'addició d'una font de l'ió calci que, quan es difon a la fase dispersa (alginat), inicia la gelificació produint-se l'encapsulació. En canvi, pel cas de la gelificació interna, l'alliberament de l'ió calci té lloc des d'un complex insoluble o parcialment soluble quan es produeix l'addició d'un àcid orgànic soluble en la fase contínua que disminueix el pH solubilitzant la sal i produint la gelificació [1].

La tècnica d'emulsió utilitza medis diferents de l'aigua per ajudar a la formació de partícules en gel. Per usos alimentaris, la solució hidrocol·loide, que conté la matriu, se suspèn en oli vegetal i després s'introdueix a la solució iònica. Les gotes de solució hidrocol·loide i els cations xoquen entre si donant lloc a la gelificació [1].

Un dels principals desavantatges de l'ús d'aquest mètode es dona quan es requereixen partícules aquoses de gel perquè l'eliminació de la fase d'oli de les gotetes pot resultar difícil. Serà necessari afegir una altra etapa de separació al procés [16].

La mida de les partícules de gel formades mitjançant aquest mètode depèn de la viscositat de l'oli en suspensió, la relació entre el component del nucli i la solució hidrocol·loide, el tipus emulsionant i la quantitat d'energia utilitzada per crear l'emulsió de l'oli hidrocol·loide [16]. Cal destacar que, en general, les microcàpsules obtingudes mitjançant la tècnica de l'emulsió són relativament més petites si es comparen amb les obtingudes amb l'extrusió. Si parlem de costos, l'emulsió és més cara a causa de l'ús d'oli vegetal en quantitats apreciables.

Coacervació

La tècnica de coacervació utilitza l'emulsió com a base pel seu desenvolupament [28]:

La coacervació és una tècnica de microencapsulació que implica la separació d'un sistema col·loidal en dues fases líquides. La fase on el component col·loide és el majoritari és el coacervat i l'altra fase és la solució d'equilibri [16].

S'utilitza per a la gelificació reversible i l'encapsulació de materials, molècules o cèl·lules biològiques [16].

En una coacervació senzilla, el polímer es separa mitjançant l'ús d'electròlits o es desubica mitjançant l'addició d'un solvent miscible no dissolt o per un canvi de temperatura [16].

En canvi, la coacervació complexa es basa essencialment en les forces atractives dels polímers amb càrrega oposada. A part, també es pot controlar per canvis de pH, temperatura o temps. Els passos que segueix es descriuen a continuació [29]:

1. L'emulsió d'un nucli hidrofòbic en una solució aquosa que conté 2 polímers diferents (normalment un polisacàrid i una proteïna, és a dir, els components de la matriu), a una temperatura i pH per sobre del punt de gelificació [29].
2. Separació de la fase líquida de la fase rica en polímer insoluble com a resultat de l'atracció electrostàtica entre polímers de càrrega oposada causada per baixar el pH de la solució per sota del punt isoelectric de la proteïna [29].
3. Formació de parets a causa de la deposició de la fase rica en polímer al voltant de les gotes hidrofòbiques, seguida d'un

refredament controlat per sota de la temperatura de gelificació [29].

4. Enduriment de la paret de les microcàpsules mitjançant l'addició d'agents de reticulació [29].

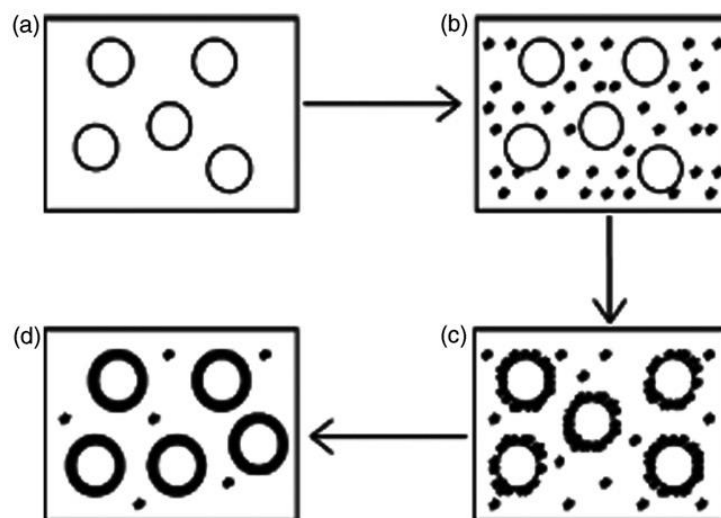


Figura 15. Evolució de la coacervació [30].

Les partícules formades a partir de la tècnica de coacervació es produeixen sovint en sistemes mixtos hidrocol·loides. Un exemple d'hidrocol·loide que pot formar sistemes de gel mitjançant una via de coacervació és la gelatina, que és capaç de formar sistemes de partícules amb goma aràbiga utilitzant aquesta tècnica [1].

Les mides de micropartícules obtingudes són de l'ordre de 150-400 μm , encara que també es poden aconseguir mides de partícules més petites de fins a 50-400 nm [1].

2.2.3.2.2 Assecat per atomització

El procediment consisteix en la preparació d'una emulsió o suspensió que contingui el compost a encapsular i el material polimèric, el qual

és polvoritzat sobre un gas calent (generalment és aire) i promou l'evaporació instantània de l'aigua, permetent que el principi actiu present quedi atrapat dins d'una pel·lícula de material encapsulant. Posteriorment, les micropartícules en pols obtingudes es separen del gas a baixes temperatures [1].

La preparació de microcàpsules amb aquesta tècnica requereix que se seleccioni el tipus d'atomitzador tenint en compte la viscositat de la solució, la mida de gota desitjada, la forma de contacte entre les gotes i l'aire calent depenent de la sensibilitat a la calor del producte, el temps de contacte gota-aire, la temperatura de l'aire i el tipus de mètode de separació dels sòlids secs [1].

Per aplicar aquesta tecnologia a l'alginat, es descriuen tres etapes: dispersió del principi actiu en el alginat, atomització de la barreja i deshidratació [1].

En la indústria, la tecnologia d'assecat per atomització és altament utilitzada ja que es fàcilment reproduïble i econòmica. S'utilitza principalment per emascarar sabors, aromes o encapsulació de vitamines. Un altre avantatge és que és apropiada per a materials sensibles a altes temperatures ja que els temps d'exposició són molt curts [1].

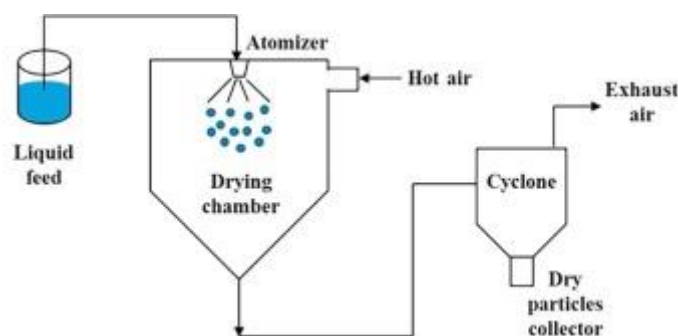


Figura 16. Esquema representatiu del procés industrial de l'assecat per atomització [27].

2.2.3.2.3 Extrusió o degoteig

La tècnica d'extrusió o degoteig consisteix en la formació de gotes de la solució d'alginat amb el component a encapsular al seu interior. Aquesta solució passa per un dispositiu extrusor de mida i velocitat de degoteig controlat per generar gotes de mida i característiques determinades. Aquestes cauen sobre un bany que conté la font de l'ió multivalent que inicia la gelificació mitjançant el mecanisme de gelificació externa [1].

Per dur a terme aquesta tècnica a petita escala, s'utilitza una xeringa com a dispositiu extrusor on es carrega la solució d'hidrocol·loide. A escala industrial, s'utilitzen extrusors comercials [16].

El principal inconvenient d'aquesta tècnica és la mida de les microcàpsules que acostuma a ser elevada perquè depèn del diàmetre del dispositiu extrusor, el cabal de la solució, la seva viscositat i tensió superficial [1]. Les mides obtingudes són de 0,5 a 6 mm amb mètodes de caiguda convencionals i a escala de centenars de micres si es fan modificacions [16].

Un altre inconvenient a nivell industrial és la baixa producció de microcàpsules ja que la formació de les microcàpsules s'aconsegueix gota a gota tenint com a conseqüència llargs temps de gelificació [1].

A més, també s'han de considerar altres aspectes que poden modificar la forma esfèrica i grandària de les càpsules produïdes com, per exemple, la distància de separació entre l'agulla i el bany de cations, l'efecte de la gravetat i la tensió superficial de la solució que conté l'hidrocol·loide [1].

Tot i això, la tècnica de microencapsulació per extrusió permet la producció de microcàpsules amb mides uniformes. A més, es poden col·locar dispositius per millorar el rendiment d'aquesta tècnica com, per exemple, dispositius extrusors com filtres múltiples i discos aspersors, injectors amb impulsos vibratoris, etc. Aquests últims consisteixen a utilitzar un sistema de pressió per forçar la sortida de l'alginat a través de la pipeta. El sistema de pressió consisteix en un sistema de vibració que permet dispersar les gotes de l'extrem de la pipeta a partícules inferiors a $300\mu\text{m}$ [1].

També cal destacar que aquesta tècnica pot ser aplicable a hidrocol·loides gelificants ràpids que no necessiten ions per a la gelificació, però també es pot fer servir per extreure gotes a un bany enduridor que conté ions per a produir la gelificació de la solució. Si el gel és ionotròpic, la concentració de la solució iònica al bany enduridor també afectarà la mida final de la partícula de gel [16].

Co-extrusió centrífuga de disc giratori

La co-extrusió centrífuga de disc giratori és el sistema d'extrusió més utilitzat a la indústria alimentària [16].

Consisteix a deixar caure la solució sobre un disc giratori que es difon en un film prim a la vora del disc. La rotació del disc i la fricció amb l'aire que l'envolta fa que la pel·lícula es desintegri en gotetes [16].

Es pot formar una àmplia gamma de mides de partícules que es pot controlar mitjançant la velocitat de rotació del disc o altres paràmetres que ja s'han explicat més amunt. Així, les distribucions de mida de partícules són molt àmplies [16].

Rarament, es produeix l'obstrucció ja que no hi ha petits orificis que es puguin bloquejar [16].



Figura 17. Imatge del disc giratori durant el procés [27].

2.2.3.2.4 Revestiment

Aquesta tecnologia consisteix en la polvorització (per *spray* superior, inferior o tangencial) d'una solució aquosa o d'un material de fusió sobre partícules sotmeses a agitació [28].

Un exemple d'aquesta tecnologia seria el recobriment en llit fluïditzat. Aquesta tècnica consisteix en la dispersió de materials sòlids, de partícules del nucli, en un corrent d'aire cap amunt dins de la cambra de recobriment. És a dir, el material del nucli de partícules sòlides es dispersa en un corrent d'aire de suport i es recobreix amb material de recobriment (normalment dissolució polimèrica) [31].

Després, es provoca l'evaporació del dissolvent i es deposita una capa de material encapsulat a la base. Cada cop que el material de nucli passa a través de la zona de recobriment, rep i augmenta el material de recobriment [31].

La següent imatge és una il·lustració d'aquest procés. Cada imatge representa les diferents opcions d'entrada del material de recobriment a la cambra.

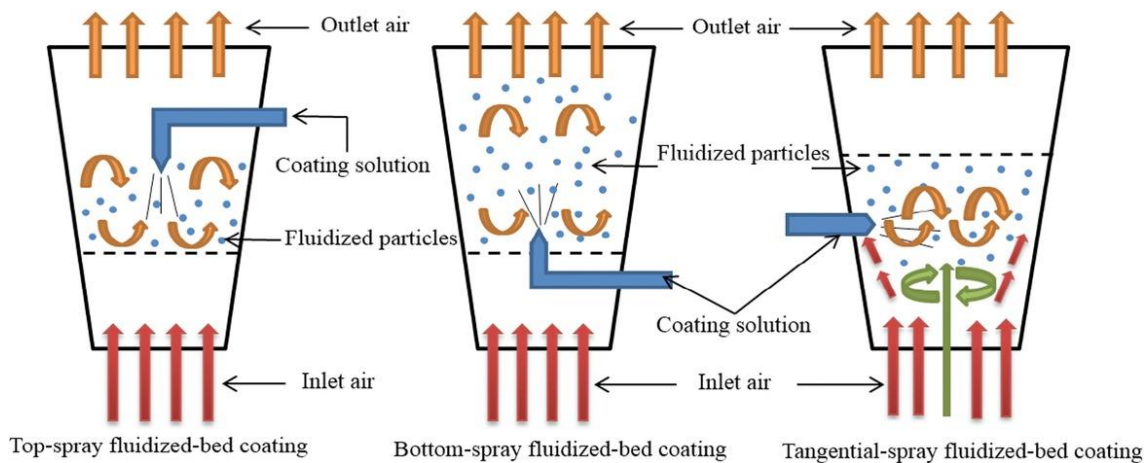


Figura 18. Esquemes dels diferents models industrials utilitzats pel revestiment [31].

2.2.3.2.5 Prilling

Aquesta tecnologia consisteix en la formació de gotetes per polvorització de material de fusió calent que conté el principi actiu i la seva solidificació en aire a temperatura ambient o freda [28].

La refrigeració per aerosol forma part d'aquest grup. Consisteix en la dispersió del material del nucli en una substància de recobriment líquida. Posteriorment es duu a terme la seva polvorització. Una altra opció és que el principi actiu s'introdueixi en una barreja de recobriment en el material principal [16].

La solidificació del recobriment s'aconsegueix congelant tèrmicament el material de recobriment fons amb un corrent d'aire fred [28].

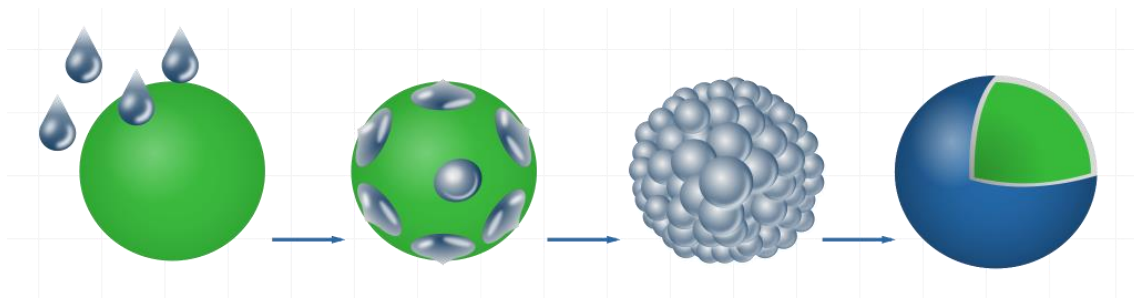


Figura 19. Representació de la formació de la càpsula mitjançant Prilling [32].

2.2.4 Aplicacions de la microencapsulació

Les microcàpsules tenen moltes aplicacions i s'utilitzen en diverses indústries com l'alimentària, farmacèutica, agrícola i cosmètica, etc. Entre els exemples d'aplicacions s'inclouen bioencapsulació, recuperació millorada d'oli o tintes, lliurament controlat de medicaments, etc. [25]

En el cas de la indústria alimentària, els materials porlimèrics que es poden utilitzar estan delimitats per reglaments. De fet, les partícules de gel hidrocol·loides procedents de polímers naturals són d'interès particular per a aquesta indústria ja que poden proporcionar certes propietats reològiques i alliberament controlat del principi actiu que necessitarien polímers modificats químicament o sintètics [25].

2.2.4.1 Aplicacions probiòtiques

Els bacteris probiòtics estan addicionats a una alta diversitat de productes alimentaris com iogurt, begudes làctiques, formatges, gelats, etc. ja que la seva ingesta té alts beneficis i avantatges [1].

Els bacteris probiòtics més utilitzats per la indústria pertanyen als gèneres *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. bulgaricus*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus* i *L. plantarum*) i *Bifidobacterium*

(*B. bifidum*, *B. adolescents*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum* i *B. thermophilum*) [33].

El seu major problema és la capacitat de supervivència dels microorganismes al processament, emmagatzematge dels aliments que els contenen o a les condicions gastrointestinals extremes [1].

Per aquest motiu, la microencapsulació de probiòtics ha estat investigada amb la finalitat trobar el mecanisme de protecció dels bacteris millorant la seva biodisponibilitat tant en els productes alimentaris com en el tracte intestinal [1].

L'alginat de sodi és un hidrocol·loide biocompatible, biodegradable i amb un perfil no tòxic [1]. Per tant, és viable utilitzar aquest polímer en la microencapsulació de probiòtics. La investigació sobre l'encapsulació d'aquests microorganismes en gel d'alginat de sodi ha estat altament prometedora i ha demostrat mantenir substancialment l'estabilitat dels bacteris tant durant l'emmagatzematge com pel pas del tracte gastrointestinal. La inclusió d'altres materials per crear sistemes mixtos també ha demostrat una millora en la viabilitat d'aquests organismes [22].

L'alginat de sodi és, de fet, el polisacàrid més utilitzat com a material encapsulant de bacteris d'àcid làctic, ja que és fàcilment manipulable per la seva naturalesa no tòxica i pel seu baix cost. [22]

Relacionat amb el que s'ha exposat anteriorment, diversos estudis *in vitro* demostren els avantatges de la microencapsulació de probiòtics utilitzant alginat com a material de recobriment. Chandramouli et al. [34] van estudiar la viabilitat de *Lactobacillus acidophilus* encapsulat a diferents concentracions d'alginat de calci en concentracions en presència de suc gàstric (pH 2,0) obtenint valors prometedors de

viabilitat. Kim et al. [35], en una altra investigació, van obtenir resultats positius per a *Lactobacillus acidophilus* encapsulat amb alginat de calci pel mètode de degoteig o extrusió durant l'exposició al tracte gastrointestinal in vitro. Ozer et al. [36] van afegir *Lactobacillus acidophilus* microencapsulat en gel d'alginat mitjançant la tècnica d'extrusió en formatge blanc i van analitzar-lo durant 90 dies d'emmagatzematge a 4 ° C i es van obtenir resultats positius.

Tot i que l'alginat de sodi és adequat per a l'encapsulament, el gel presenta porositat i sensibilitat a un pH extrem, que pot interferir tant en l'alliberament com en la protecció dels compostos. Hi ha diverses maneres de superar aquest obstacle i millorar l'estabilitat dels microorganismes com, per exemple, l'addició de prebiòtics en la formulació de la càpsula ja que aquests formen xarxes tridimensionals de microcristalls que, quan interactuen entre si, formen agregats que ajuden a protegir les cèl·lules bacterianes [1].

Cal dir que els prebiòtics són substàncies no digeribles, resistents a la hidròlisi a l'estómac i a l'intestí prim. Entre els prebiòtics emprats en la microencapsulació de probiòtics destaquen: fructooligosacàrids, inulina i midons resistents [22].

Homayouni [37] va demostrar que una combinació d'alginat amb midó millora l'eficiència de diferents cèl·lules bacterianes, particularment de bacteris productors d'àcid làctic gràcies a la producció d'una bona estructura prebiòtica. Mirzaei et al. [38] van obtenir resultats satisfactoris per produir formatge amb *Lactobacillus acidophilus* utilitzant alginat de sodi i midó com a materials encapsulants.

Conjuntament amb la tècnica que permet combinar l'ús de diferents materials creant sistemes mixtos per produir la matriu de la microcàpsula explicada anteriorment, Krasaekoopt i Watcharapoka

[39] van realitzar un altre estudi que va analitzar l'efecte dels galactoligosacàrids i la insulina en la supervivència de *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus casei* microencapsulats en alginat de calci recobert de quitosà en el sistema digestiu simulat. Les càpsules es van afegir al iogurt i al suc de fruita i es va obtenir la viabilitat durant l'emmagatzematge en refrigeració durant un mes.

A la següent taula, s'enumeren alguns estudis sobre microcàpsules produïdes amb alginat de sodi combinades amb altres polímers, alguns considerant-se prebiòtics.

Microorganisms	Special treatment
<i>Lactobacillus</i> spp.	Chitosan and Corn starch
<i>Lactobacillus gasseri</i> e <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Chitosan
<i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium lactis</i>	Resistant starch
BAL	Starch
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12	Chitosan-acryl-eze
<i>Bifidobacterium</i>	Poli-L-lisine
<i>Lactobacillus casei</i>	Starch
<i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Resistant starch
<i>Lactobacillus casei</i>	Starch

Taula 1. Llistat de diferents microorganismes i el material que es va utilitzar per encapsular-los [22].

2.2.4.2 Aplicacions del llevat encapsulat

L'ús de la microencapsulació té com a objectiu augmentar i regular la biomassa per millorar el procés de fermentació, l'obtenció de metabòlits secundaris d'interès industrial, etc.

Amb la microencapsulació, es busca crear sistemes fermentadors estables regulats amb unes cinètiques concretes obtingudes a partir de l'estudi i disseny de diferents tipus de càpsules.

Per tant, els sistemes de bacteris fermentadors encapsulats ofereixen unes característiques que permeten optimitzar i regular la fermentació

alhora de mantenir al llevat sota unes condicions adequades per a la seva supervivència.

2.2.4.3 Altres aplicacions: alimentació

Alhora d'utilitzar la microencapsulació en la producció alimentària de productes funcionals, s'ha de tenir en compte que la incorporació de microcàpsules no pot modificar la textura ni el gust original de l'aliment. Les diferents aplicacions utilitzen com a principi actiu vitamines, minerals, àcids grassos, microorganismes probiòtics, proteïnes, aminoàcids, polifenols, fibres i enzims [1].

A més, gràcies a la seva versatilitat, l'encapsulació també es pot utilitzar en l'alta cuina: l'"Sferificació" és tècnica culinària que té com a propòsit modificar les propietats texturals dels aliments per així desenvolupar noves sensacions. [1]



Figura 20. Imatge d'olives encapsulades amb alginat [40].

2.3 Fermentació

2.3.1 Llevat

El llevat o ferment és un conjunt de diversos fongs generalment són microscòpics i unicel·lulars. És a dir, no és possible veure'ls a ull nu, només en conjunt formant agregats o mitjançant eines com microscopis [41].

Duen a terme processos de descomposició (per fermentació) de diferents substàncies orgàniques, específicament sucres i altres carbohidrats. A més, d'aquesta reacció s'obtenen com a subproducte altres substàncies específiques [41].

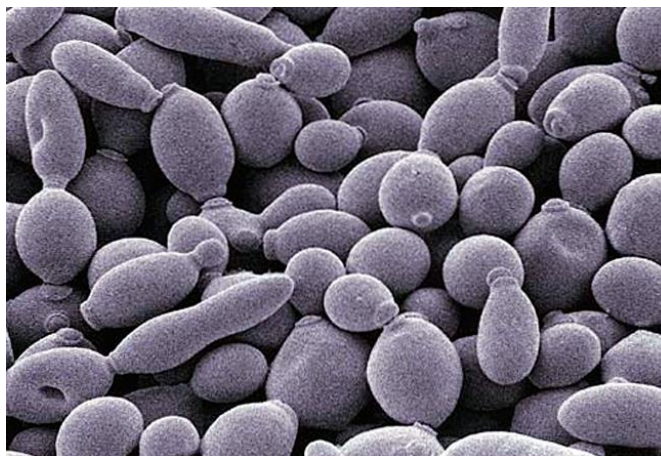


Figura 21. Imatge del llevat "Velluto BMV58" [42].

Els llevats són microorganismes comuns al nostre voltant i ambient de vida, trobant-los en plantes, animals i insectes o, també, en superfícies com closques de fruites i la nostra pròpia pell [43].

Són conegudes unes 500 espècies de llevats. Per primera vegada, van ser identificades per Louis Pasteur l'any 1857 gràcies a la seva capacitat de fermentació [43].

La paraula "llevat" prové de el llatí "levare", que vol dir "aixecar". Aquest nom prové del fet que produeix diòxid de carboni que causa l'expansió de les proteïnes del gluten a la farina i fa que s'expandeixi la massa [43].

L'ús del llevat és molt variat i elevat en diferents processos industrials i biotecnològics. Per exemple, en l'elaboració del pa, en la preparació de begudes alcohòliques com la cervesa i el vi [41].

Altres usos es basen en què hi ha certs tipus de llevats que segreguen naturalment antibiòtics per combatre els seus enemics microscòpics. Aquest procés permet obtenir aquestes substàncies amb fins mèdics i farmacèutics. De fet, la producció de proteïnes amb finalitats terapèutiques amb llevats ha estat estudiada des de 1980 per a la producció de proinsulina, insulina, etc. [41]

Cal destacar també que en un medi favorable nutricionalment, són microorganismes capaços de reproduir-se ràpidament ja que són organismes simples i eficaços. El seu temps de reproducció varia entre espècies i és de 2 a 3 hores en les millors condicions de creixement. Relacionat amb això, la simplicitat biològica dels llevats els fa idonis per a l'experimentació en el camp genètic ja que són barats, fàcils de reproduir i simples en el seu funcionament cel·lular [41].

També existeix un altre camp d'estudi que s'ha centrat en la seva estructura cel·lular. Els llevats presenten una alta concentració d'aminoàcids, pèptids, carbohidrats i sals, que poden ser extrets. Aquests compostos presenten propietats antioxidants i també són utilitzats com savoritzants en sopes, salses, preparacions de carns, condiments i com a suplementes alimentaris en el menjar d'alguns animals com aus i porcs [43].

2.3.1.1 Tipus de llevats utilitzats en alimentació

Hi ha diversos tipus de llevats que existeixen en diferents ambients en diferents condicions i que es poden reproduir tant sexualment (mitjançant espores) com asexual (per gemmació o brotada).

En funció d'aquestes característiques i de la forma que tenen alhora de ser comercialitzats o utilitzats en alimentació, independentment de l'espècie, es poden classificar en tres tipus [41]:

- Llevat premnat o llevat fresc. S'ha de conservar en un àmbit fred. Ve premnat en blocs de pasta. S'ha de diluir en aigua abans d'utilitzar-lo. Sol estar composta per bacteris del tipus *Saccharomyces cerevisiae* [41].
- Llevat sec. Semblant al premnat, però en presentacions segellades al buit, deshidratades i granulades (en pols). Poden afegir-se directament al substrat. Solen tenir temps de caducitat més llargs que el llevat fresc o natural [41].
- Llevat natural. Anomenat també "massa mare". S'ha de deixar en repòs abans d'utilitzar-lo en el conjunt de la preparació [41].



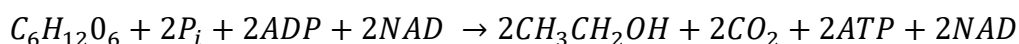
Figura 22. Imatge de les diferents formes comercials del llevat [44].

2.3.2 Processos de fermentació

La fermentació és el procés dut a terme pel llevat per aconseguir energia. Els dos principals tipus de fermentació són l'alcohòlica i la làctica i es classifiquen en funció del producte final obtingut.

2.3.2.1 Fermentació alcohòlica

Aquest procés és el descomposició en condicions anaeròbiques, és a dir, en absència d'oxigen. El substrat constituït per carbohidrats glúcids com la glucosa, sacarosa, fructosa, etc. són convertits en alcohol (etanol generalment), diòxid de carboni i dues molècules d'adenosina trifosfat (ATP). La equació química general que segueix aquesta reacció és la següent [41]:



Equació 5. Equació general de la fermentació alcohòlica [41].

2.3.2.1.1 Descripció de la reacció

La fermentació alcohòlica és un procés exotèrmic, és a dir, es desprèn energia en forma de calor [45].

Tot i que és un procés que es dona en condicions anaeròbiques, l'oxigen és el desencadenant inicial de la fermentació, ja que els llevats ho necessitaran en la seva fase de creixement [45].

La fermentació consta del procés de la glucòlisi, la via d'extracció d'energia, i una o dues reaccions extres al final. És a dir, es diferencien dues etapes diferents: la primera seria la glucòlisi i la segona és l'etapa de regeneració del NAD^+ que és un enzim necessari per dur a terme la glucòlisi [46].

En la primera etapa de la fermentació, la glucòlisi, es produeix el piruvat. En la segona etapa, per obtenir etanol a partir de piruvat, ocorren dos passos. En el primer pas, al piruvat se li retira un grup carboxil i s'allibera com a diòxid de carboni i es produeix una molècula de dos carbonis anomenada acetaldehid. En el segon pas, el NDAH dona els seus electrons a l'acetaldehid i es regenera l' NDA^+ alhora que genera etanol [46].

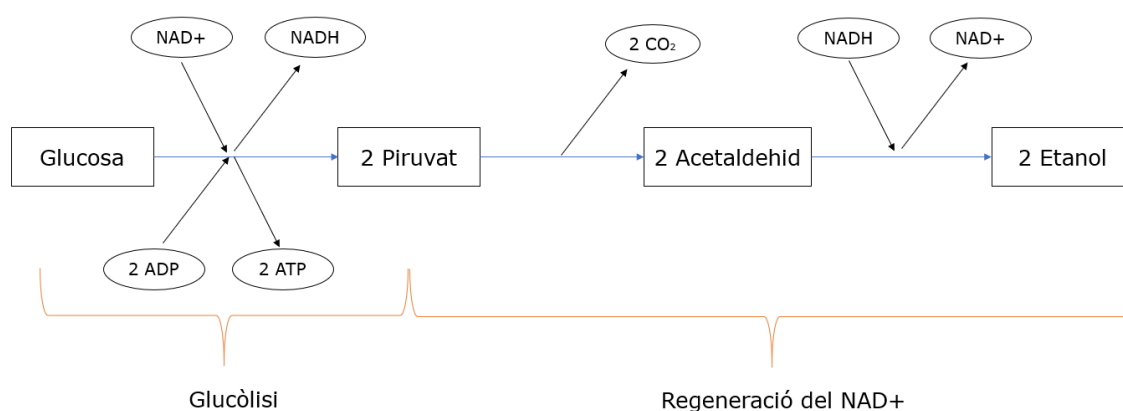


Figura 23. Esquema de l'evolució de la reacció de fermentació alcohòlica.

S'ha de considerar que l'etanol va augmentant de concentració durant el procés de fermentació i, pel fet que és un compost tòxic, quan la seva concentració arriba aproximadament un 12% de volum, els llevats tendeixen a morir. L'etanol actua com a agent desnaturalitzador: actua directament sobre les proteïnes i provoca una inhibició dels enzims i, a més, actua sobre la integritat de les membranes lipídiques afectant els components de la membrana, proteïnes de transport, etc. Per aquesta raó, les begudes alcohòliques no destil·lades no tenen concentracions d'alcohol superiors als 20% [46].

A part, el diòxid de carboni (CO_2) en estat gasós és el que provoca el bombolleig i l'aroma característic de les begudes alcohòliques fermentades [46].

Es podria descriure la reacció de la fermentació com la reducció de dues molècules de nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD^+), un enzim present a les cèl·lules dels llevats amb un balanç final de dues molècules d'ADP que es converteixen en ATP [46].

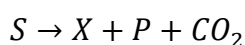
Altres compostos que també poden aparèixer com a productes d'aquesta reacció, però en menors proporcions, són l'àcid succínic, el glicerol, l'àcid fumàric [45].

2.3.2.1.2 Cinètica de la reacció

A l'hora d'investigar la cinètica de la reacció de fermentació entre el llevat i els sucres, s'han de tenir en compte moltes variables experimentals ja que aquestes poden intervenir en la cinètica de la reacció: la concentració dels sucres, la possible addició d'aliments diferents a la glucosa, l'agitació, l'aeració, pH, temperatura, entre altres. Les diferents condicions experimentals comportaran que la velocitat de fermentació tingui patrons d'evolució diferents [47].

A més, un dels principals desavantatges dels sistemes que utilitzen cèl·lules floculants (bacteris o llevats) és que la velocitat de reacció és baixa. La principal causa d'aquest fet és que la reacció està controlada per la velocitat de difusió del substrat o sucres dins dels flocs de llevat que és inferior a la velocitat de fermentació [47].

Per estudiar les cinètiques de reacció de la fermentació alcohòlica, es considera que la reacció segueix bàsicament el següent esquema:



Equació 6. Equació general simplificada de la fermentació alcohòlica.

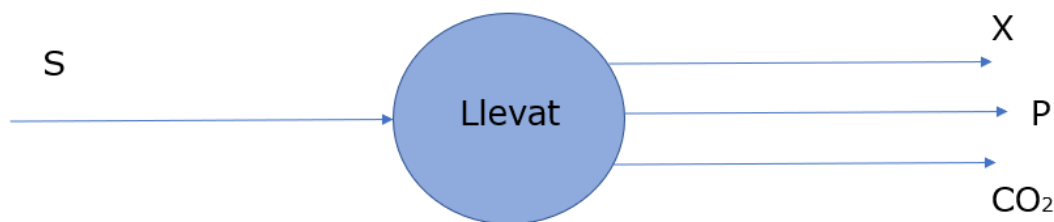


Figura 24. Esquema dels elements mesurats per l'estudi de l'evolució de la fermentació alcohòlica.

És a dir, en condicions anaeròbiques, els sucres o substrat són metabolitzats en X (població de llevat), P (etanol) i CO₂ [47].

S'ha observat que la velocitat de fermentació experimenta les següents fases [48]:

1. Increment fins a la velocitat de reacció màxima
2. Un curt període de temps quasi estacionària
3. Una ràpida reducció de la velocitat de forma asimptòtica

Aquesta velocitat de fermentació es pot calcular directament a partir de les dades de consum de sucres. Una altra opció és calcular-ho a partir de la producció de CO₂ en la reacció [48].

Una expressió que té en compte la velocitat de dispersió és la següent, que permet on la velocitat de fermentació (f) es calcula tenint en compte la concentració de substrat (S), la constant de reacció (k) i la constant μ que depèn de la difusió [48].

$$f = \frac{\mu \cdot k}{k - \mu} \cdot S_0 \cdot (e^{-\mu t} - e^{-kt})$$

Equació 7. Equació de la velocitat de fermentació alcohòlica [48].

Per resoldre aquesta equació, ja que es complica obtenir els valors necessaris per poder calcular μ , s'utilitzen dos valors de la velocitat coneguts per formar un sistema d'equacions [48].

Tot i això, hi ha la possibilitat de simplificar aquesta equació perquè a altes velocitats d'agitació, els efectes de la velocitat de difusió es redueixen. També, provoca una fase estacionària de la velocitat de fermentació més llarga. Al gràfic següent es mostra l'evolució de les velocitats de fermentació a diferents velocitats d'agitació. També es poden diferenciar les 3 fases de la velocitat que s'han descrit al principi d'aquest sub-apartat [48].

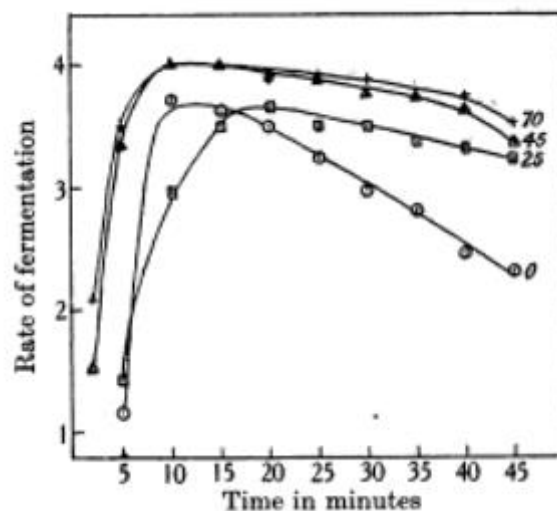


Figura 25. Evolució de la velocitat de fermentació en diferents casos on s'ha modificat la velocitat d'agitació (rpm) [48].

Cal tenir en compte que a baixes concentracions, entre el 0 i 10% en pes de glucosa, s'ha observat que la fase 1 és més llarga que a concentracions més elevades [48].

Matemàticament, s'ha comprovat que no existeix una relació proporcional entre la quantitat de llevat que participa en la reacció i la velocitat de reacció si es treballa amb baixes concentracions de llevat [48].

Segons Zinnai et al. [49], l'evolució de la concentració de substrat en funció del temps segueix la següent equació:

$$[S]_t = [S]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

Equació 8. Equació simplificada de la velocitat de reacció de la fermentació alcohòlica.

on k representa la constant de reacció, la concentració de substrat a un temps t dependrà de la concentració inicial i decaurà ràpidament de forma exponencial. Aquesta expressió s'utilitza en casos generals on s'ha considerat que algunes variables com les que s'han comentat anteriorment (velocitat de difusió, concentració de llevat, etc.), no influeixen a la reacció.

El següent gràfic mostra l'evolució de la concentració en funció del temps en l'experiment realitzat per Zinnai et al. [49]. De fet, aquest gràfic està format per uns valors que han sigut calculats a partir de l'última expressió en forma de corba i els valors que es van obtenir experimental durant la fermentació de la glucosa per llevat de l'espècie *Sacharomyces Cerevisiae* representants en forma de símbols: els triangles representen l'etanol i els rombes, la glucosa. La línia central representa l'equilibri de massa i les creus, els seus valors experimentals.

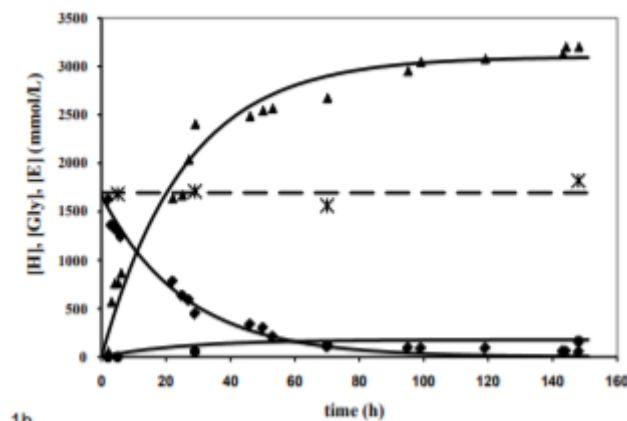


Figura 26. Gràfica de les estimacions teòriques en front de les dades experimentals obtingudes [49].

Es pot observar que els valors teòrics reproduïen amb fidelitat la cinètica de la reacció de fermentació. Tot i això, en aquest exemple no es pot observar la fase 1 de la fermentació que abans s'ha explicat.

2.3.2.1.3 Etapes de la fermentació industrials

Quan la fermentació es duu a terme a nivell industrial, en funció de les condicions (quantitat de sucre disponible, temperatura, oxigen, etc.) i dels llevats que actuen, es poden distingir diverses fases en la fermentació [50]:

- 1a fase: predominen llevats no esporògenes que resisteixen un grau alcohòlic 4-5. Són sensibles a l'anhídrid sulfurós.
- 2a fase: predomina el *Sacharomyces cerevisiae* que resisteix fins a un grau d'alcohol entre 8 i 16. En aquesta fase té lloc la màxima capacitat fermentativa.
- 3a fase: segueix actuant *Sacharomyces Cerevisiae* al costat de *Sacharomyces Oviformis*. També poden existir altres microorganismes que solen ser fongs, entre els quals destaquen *Penicillium*, *Aspergillus*, *Oidium*.

2.3.2.1.4 Condicions necessàries per dur a terme la fermentació alcohòlica

La reacció de fermentació està produïda per un llevat, un ésser viu, i és molt sensible a les condicions ambientals. Quique Collado les descriu al seu article [51]:

- **Temperatura:** Els llevats són microorganismes mesòfils, és a dir, la fermentació pot donar-se en un rang de temperatures molt ampli, des dels 13-14°C fins els 33-35°C. Dins d'aquest rang, com més gran sigui la temperatura més gran serà la velocitat de la

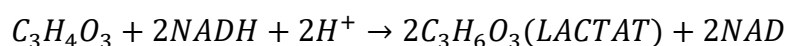
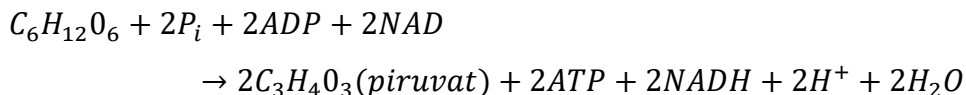
fermentació. Tot i això, les altes temperatures provoquen que els llevats s'esgotin abans. Així que s'aconsegueixen graduacions alcohòliques més altes a baixes temperatures. Per tant, la temperatura més adequada per a realitzar la fermentació alcohòlica se situa entre els 18-23°C, la utilitzada generalment en l'elaboració de vins.

- **Aeració:** els llevats requereixen una certa ventilació o oxigenació per poder dur a terme la fermentació. Aquesta oxigenació s'ha de fer en els passos previs a la fermentació. L'aparició de l'aigua i l'anhidric carbònic en comptes de l'alcohol és causat per l'excés de ventilació ja que els llevats no consumeixen els sucres per via fermentativa en condicions aeròbiques, sinó que ho fan mitjançant un mètode que els permet obtenir molta més energia, la via oxidativa.
- **pH:** un ambient amb un pH baix (més baix de 4) no és adequat per a la supervivència dels llevats. Durant el procés, s'ha de tenir en compte que hi ha tipus de llevats, com el *Saccharomyces cerevisiae*, que duu a terme processos que baixen el pH.
- **Nutrients i Activadors:** a més de la glucosa, els llevats necessiten altres substrats o nutrients com són nitrogen, fòsfor, carboni, sofre, potassi, magnesi, calci i vitamines (sobretot, vitamina B1). De tots aquests, el nitrogen és el més important. La forma més utilitzada d'aquest nutrient és el nitrogen amoniacal o aminoàcids. Una deficiència d'aquest provocarà que els llevats comencin a consumir el nitrogen que contenen dins de la seva pròpia estructura alliberant H₂S (aroma a ous podrits).
- **Inhibidors:** s'ha d'evitar la presència d'inhibidors com restes de productes fitosanitaris i àcids grassos saturats de cadena curta.

- **Concentració inicial de sucres:** una concentració molt elevada de sucres provocarà que els llevats simplement esclatin ja que alliberaran bruscament l'aigua del seu interior per equilibrar les concentracions de soluts a l'exterior i a l'interior de la cèl·lula. Tindrà lloc el que es coneix com una plasmòlisi.

2.3.2.2 Fermentació làctica

Aquest tipus de fermentació és dut a terme per alguns organismes (protozoous) i teixits animals en absència d'oxigen. Es produeix, igual que en la fermentació alcohòlica, per la descomposició de la glucosa (glucòlisi) i la reducció del piruvat. Amb aquesta reacció, però, s'obté una menor quantitat d'energia i es produeix com a producte el lactat (forma ionitzada de l'àcid làctic). L'equació general que descriu el procés és la següent [41]:



Equació 9. Equació general de la fermentació làctica [41].

2.3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

L'espècie més coneguda i utilitzada de llevat és el *Saccharomyces cerevisiae*, també conegut com el llevat de cervesa. Aquest nom és degut a que és utilitzada durant la producció d'aquesta beguda [43].

Aquesta és una espècie de fong unicel·lular que pertany al tall *Ascomicota*, a la classe *Hemiascomicete* i a l'ordre *Saccharomicetales*. Es pot trobar en una gran diversitat d'hàbitats com fulles, flors, terra i aigua. Filogenèticament, les soques de *Saccharomyces cerevisiae* que

componen l'espècie en el seu conjunt constitueixen dues poblacions, les domèstiques i les salvatges [52].

És un microbi unicel·lular eucariota, de forma globular, verd groguenc. És quimioorganotrof, ja que requereix de compostos orgànics com a font d'energia i no requereix de llum solar per créixer. Aquest llevat és capaç d'utilitzar diferents sucres per obtenir energia, sent la glucosa la font de carboni preferida [52].

S. cerevisiae és anaerobi facultatiu ja que és capaç de créixer en condicions de deficiència d'oxigen duent a terme la fermentació alcohòlica. Tot i això, no s'ha d'oblidar que és capaç de metabolitzar la glucosa i la fructosa tant per via respiratòria com per via fermentativa, és a dir, de créixer en condicions aeròbies o anaeròbies [52].

2.3.3.1 Aplicacions

Les aplicacions d'aquest llevat són molts diverses: estudi en laboratori de processos biològics en cèl·lules, producció d'aliments, etc. [43]

Diferents autors defensen que el *S. cerevisiae* va ser seleccionat com a model d'estudi de laboratori des de 1930 perquè dur a terme mecanismes moleculars que tenen lloc durant el cicle cel·lular en cèl·lules eucariotes, és a dir, processos essencials que són duts a terme per les cèl·lules animals, per exemple, en humans. Això permet realitzar experiments en aquests organismes amb diferents malalties (com, per exemple, l'Alzheimer) i observar els seus efectes extrapolant-los als humans [43].

S. cerevisiae també s'utilitza en la fermentació del pa, cervesa, vi i producció d'alcohol. És l'espècie més resistent a l'etanol, resistint fins a concentracions del 14% d'etanol en el seu medi [43].

A banda d'aquestes aplicacions, actualment és un fong molt utilitzat en la biotecnologia per a la producció d'insulina, anticossos, albúmina, etc. [43]

3. Marc experimental

3.1 Anàlisi DNS

3.1.1 Procediment

Aquest primer experiment consisteix en la preparació del reactiu DNS, que, com s'ha explicat prèviament, serveix per analitzar la concentració de la glucosa en una dissolució i la realització d'una recta de calibratge a partir de cinc dissolucions amb concentracions diferents d'aquest carbohidrat.

Per produir el reactiu DNS s'ha seguit el model utilitzat per Nwogwugwu et al. [4] . Alhora, les concentracions que inicialment s'han utilitzat per realitzar la recta de calibratge són : [0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1] g/L [4] . Originalment, s'ha preparat un dissolució mare de glucosa 1 g/L que mitjançant dissolucions en aigua destil·lada ha permès obtenir la resta de concentracions. El mètode consisteix en dissoldre una quantitat determinada de mil·lilitres de dissolució mare en un matràs aforat de 50 mL.

3.1.1.1 Reactius i material

Reactius	Materials
Àcid 3,5-dinitrosalicílic	Vasos de precipitats
Tartrat sòdic potàssic	Matrassos aforats
Hidròxid de sodi	Pipetes
Glucosa	Comptagotes
Aigua destil·lada	Tubs d'assaig
	Espectrofotòmetre d'absorció
	Bany tèrmic

Taula 2. Taula de reactius i materials utilitzats per obtenir el reactiu DNS i la recta de calibratge.

3.1.1.2 Preparació del reactiu DNS

El reactiu és una solució formada pels següents compostos: àcid 3, 5-dinitrosalicílic (DNS), la sal de Rochelle (tartrat de sodi-potassi), que impedeix la dissolució d'oxigen en el reactiu, i hidròxid de sodi, per proporcionar el medi necessari perquè es produeixi la reacció redox [5].

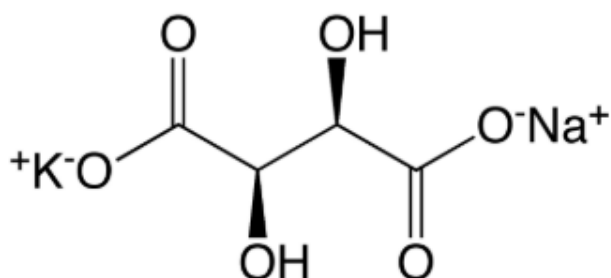


Figura 27. Estructura del tartrat de sodi-potassi [53].

El procediment a seguir per produir el següent reactiu és el següent:

1. Preparació d'una dissolució 2M d'hidròxid de sodi (NaOH)
2. Dissolució del tartrat en aigua destil·lada a una temperatura aproximada de 30°C. Posteriorment, s'ha d'enrasar en un matràs aforat.
3. Dissolució del DNS en 25 mL de la dissolució de NaOH prèviament preparada.
4. Addició del tartrat a la dissolució de NaOH i DNS. Un cop s'obté una mescla homogènia, s'enrasa en un matràs aforat de 250 mL.

Les dissolucions han de ser preparades amb aquestes concentracions i quantitat de reactiu:

- NaOH: 25 mL de dissolució 2M

$$25 \text{ mL} \cdot \frac{2 \text{ mol NaOH}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{40 \text{ g NaOH}}{1 \text{ mol NaOH}} = 2 \text{ g de NaOH}$$

- Tartrat sòdic potàssic: 50 mL de dissolució 600g/L

$$50 \text{ mL} \cdot \frac{600 \text{ g de tartrat}}{1000 \text{ mL}} = 30 \text{ g de tartrat}$$

- Àcid 3,5-dinitrosalícilic: concentració de 0.05 g/mL

$$25 \text{ mL} \cdot \frac{0.05 \text{ g de DNS}}{1 \text{ mL}} = 1.25 \text{ g de DNS}$$

3.1.1.3 Reacció del reactiu DNS amb la glucosa

El mètode per dur a terme aquesta reacció té els següents passos:

1. En tub d'assaig, es dissolen 1 mL de la dissolució de glucosa i 2 mL del reactiu DNS.
2. Es fa un bany tèrmic en aigua bullint durant 5 minuts de la dissolució i, un cop passat aquest temps, es col·loca en aigua freda 2 minuts per reduir la temperatura i aturar la reacció.
3. S'afegeixen 7 mL d'aigua.

3.1.2 Experiments realitzats

Un problema observat en aquest reactiu és que es degrada amb facilitat en el temps i sota la llum solar. Per evitar errors experimentals causats per aquesta degradació s'ha preparat dues vegades el reactiu: una primera vegada durant la realització de la recta de calibratge i l'anàlisi de la reacció de fermentació sense encapsulament i, la segona,

per fer l'anàlisi de la reacció de fermentació amb llevat encapsulat ja que la distància en el temps de realització d'aquestes activitats és elevada.

3.1.2.1 Primer reactiu preparat i dissolucions de la corba de calibratge

La recta que s'obté amb aquest primer experiment serà la utilitzada per analitzar la cinètica de la reacció de fermentació del llevat sense encapsular.

3.1.2.1.1 Dades experimentals

Reactius consumits	
DNS	1.254 g
Tartrat sòdic potàssic	29.992 g
NaOH	1.962 g
Glucosa	0.254 g

Taula 3. Reactius consumits per obtenir el DNS i la recta de calibratge.

Obtenint unes dissolucions amb les següents concentracions reals:

- NaOH: 25 mL de dissolució teòrica 2M

$$\frac{1.962 \text{ g NaOH}}{25 \text{ mL}} \cdot \frac{1 \text{ mol de NaOH}}{40 \text{ g NaOH}} \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 1.962 \text{ M NaOH}$$

- Tartrat sòdic potàssic: 50 mL de dissolució teòrica 600g/L

$$\frac{29.992 \text{ g de tartrat}}{0.05 \text{ L}} = 599.84 \text{ g/L de tartrat}$$

- Àcid 3,5-dinitrosalicílic: concentració teòrica de 0.05 g/mL

$$\frac{1.254 \text{ g de DNS}}{25 \text{ mL}} = 0.050 \text{ g/mL de DNS}$$

- Glucosa: 250 mL de dissolució teòrica 1 g/L

$$\frac{0.254 \text{ g}}{0.25 \text{ L}} = 1.016 \text{ g/L}$$

- Glucosa: 50 mL de dissolució teòrica 0.8 g/L.

Mil·lilitres dissolts de la dissolució mare:

$$50 \text{ mL} \cdot \frac{0.8 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL dissò}} \cdot \frac{1000 \text{ mL dissò mare}}{1.016 \text{ g de glucosa}} = 39.4 \text{ mL dissò mare}$$

- Glucosa: 50 mL de dissolució teòrica 0.6 g/L.

Mil·lilitres dissolts de la dissolució mare:

$$50 \text{ mL} \cdot \frac{0.6 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL dissò}} \cdot \frac{1000 \text{ mL dissò mare}}{1.016 \text{ g de glucosa}} = 25.5 \text{ mL dissò mare}$$

- Glucosa: 50 mL de dissolució teòrica 0.4 g/L.

Mil·lilitres dissolts de la dissolució mare:

$$50 \text{ mL} \cdot \frac{0.4 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL dissò}} \cdot \frac{1000 \text{ mL dissò mare}}{1.016 \text{ g de glucosa}} = 19.7 \text{ mL dissò mare}$$

- Glucosa: 50 mL de dissolució teòrica 0.2 g/L.

Mil·lilitres dissolts de la dissolució mare:

$$50 \text{ mL} \cdot \frac{0.2 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL dissò}} \cdot \frac{1000 \text{ mL dissò mare}}{1.016 \text{ g de glucosa}} = 9.8 \text{ mL dissò mare}$$

3.1.2.1.2 Resultats

El reactiu DNS és el següent:

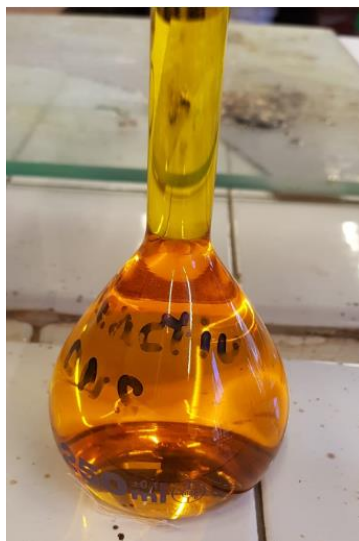


Figura 28. Imatge del reactiu DNS preparat al laboratori.

Es pot observar que ha obtingut el color vermellós-marronós característic.

S'ha preparat el tub d'assaig tal i com s'ha explicat anteriorment i es posa en un bany tèrmic. A continuació es mostra l'evolució del canvi de color que succeeix durant els minuts de bany tèrmic:



Figura 29. Evolució del canvi de color que experimenta la dissolució a mida que la reacció entre el DNS i la glucosa té lloc.

En dur a terme la reacció amb les diferents dissolucions de glucosa, s'obtenen aquest productes:

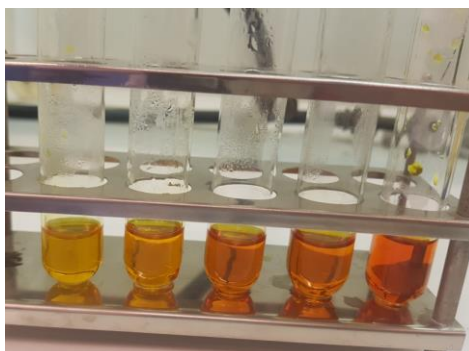


Figura 30. Dissolucions patrons utilitzades per fer la recta de calibratge.

Es pot observar una gradació en el color de les dissolucions. Això és conseqüència de la reacció entre el DNS i la glucosa on s'obté un color més fosc per a les dissolucions més concentrades de l'última.

A continuació, s'analitzen aquests productes en l'espectrofotòmetre.

Inicialment, la prova s'ha realitzat utilitzant com a blanc la dissolució de DNS mesclada amb una dissolució sense glucosa. Les lectures d'aquest primer anàlisi han tingut una baixa variació de l'absorció en funció de la concentració de les dissolucions. Per tant, les lectures no són concloents i no permeten obtenir una recta de calibratge.

A continuació, es fa la mateixa anàlisi, però utilitzant com a blanc aigua destil·lada. Els resultats obtinguts aquest cop sí que varien. No obstant això, per longituds d'ona inferiors a 700 nm, el resultat de l'absorbància sobrepassa el valor d'1, quan l'absorbància no hauria de sobrepassar aquest valor.

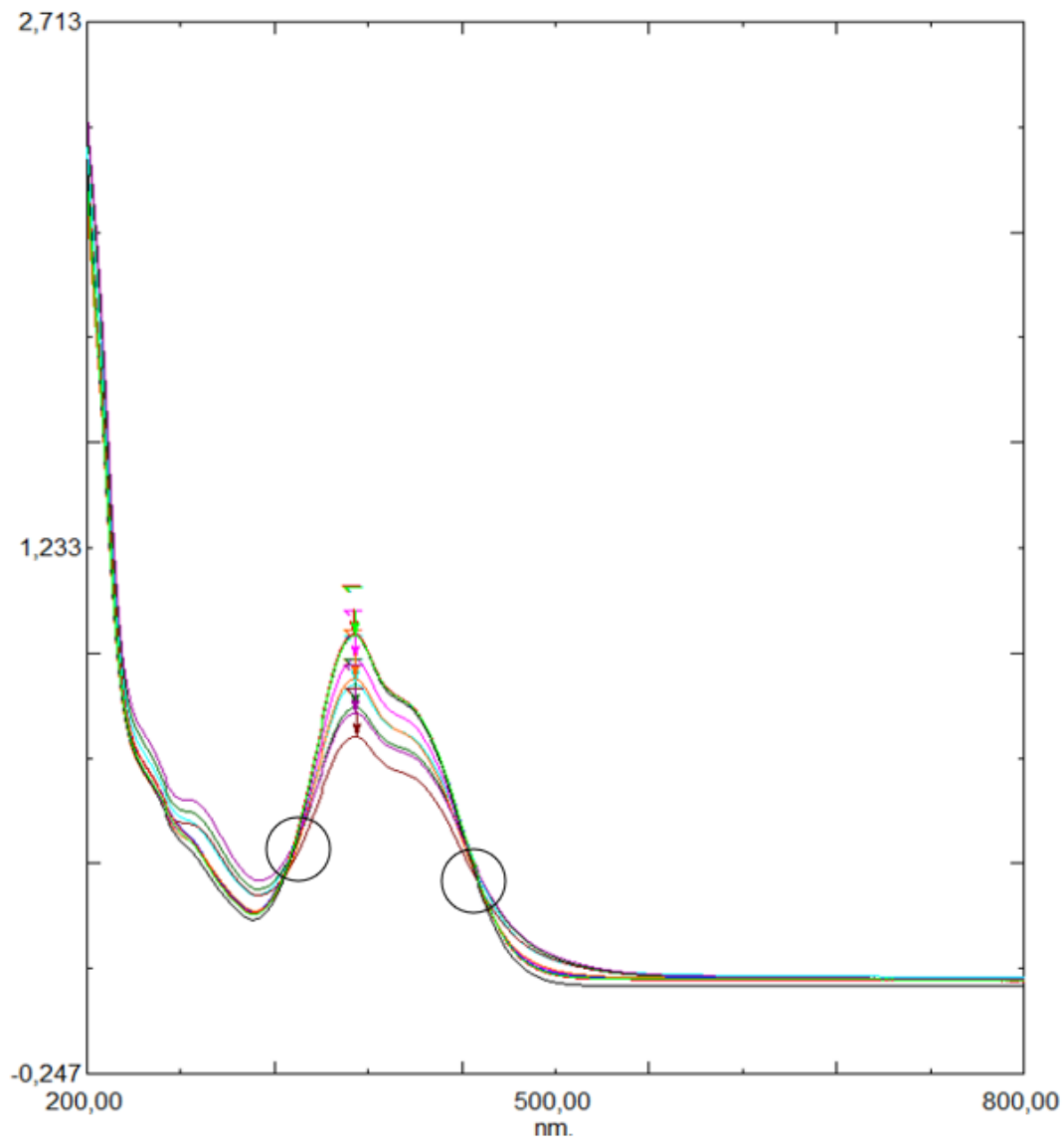


Figura 31. Gràfica de les lectures obtingudes sense dissoldre les mostres.

El problema és que les concentracions de glucosa són massa elevades.

També es pot observar dos punts isobèstics a cada banda del punt màxim d'absorció assenyalats en els cercles negres.

Primer s'ha dissolt 1 mL d'aquestes dissolucions en 50 mL, però es continuen obtenint valors massa alts. El segon pas ha sigut dissoldre diferents quantitats de mL de dissolució de 0,2 g/L de glucosa en 5 mL

de dissolució amb aigua destil·lada, però els valors continuen sent molt grans.

$$1 \text{ mL de dissó} \cdot \frac{0,2 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{0.005 \text{ L de la nova dissó}} = 0.004 \text{ g/L}$$

$$2 \text{ mL de dissó} \cdot \frac{0,2 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{0.005 \text{ L de la nova dissó}} = 0.008 \text{ g/L}$$

$$3 \text{ mL de dissó} \cdot \frac{0,2 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{0.005 \text{ L de la nova dissó}} = 0.012 \text{ g/L}$$

$$4 \text{ mL de dissó} \cdot \frac{0,2 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{0.005 \text{ L de la nova dissó}} = 0.016 \text{ g/L}$$

$$5 \text{ mL de dissó} \cdot \frac{0,2 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{0.005 \text{ L de la nova dissó}} = 0.02 \text{ g/L}$$

Finalment, s'ha agafat 1 mL de cada una d'aquestes i s'ha dissolt en aigua destil·lada per obtenir una nova dissolució de 100 mL. Les dissolucions obtingudes i les seves concentracions són les següents:

$$1 \text{ mL de dissó} \cdot \frac{0,004 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{0.1 \text{ L de la nova dissó}} = 0.00004 \text{ g/L}$$

$$1 \text{ mL de dissó} \cdot \frac{0,008 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{0.1 \text{ L de la nova dissó}} = 0.00008 \text{ g/L}$$

$$1 \text{ mL de dissó} \cdot \frac{0,012 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{0.1 \text{ L de la nova dissó}} = 0.00012 \text{ g/L}$$

$$1 \text{ mL de dissó} \cdot \frac{0,016 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{0.1 \text{ L de la nova dissó}} = 0.00016 \text{ g/L}$$

$$1 \text{ mL de dissó} \cdot \frac{0,020 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{0,1 \text{ L de la nova dissó}} = 0,00020 \text{ g/L}$$

A la següent figura, es pot observar el canvi d'intensitat en el color de la dissolució a analitzar. Aquesta disminució permet obtenir lectures d'absorció viables per al seu estudi.

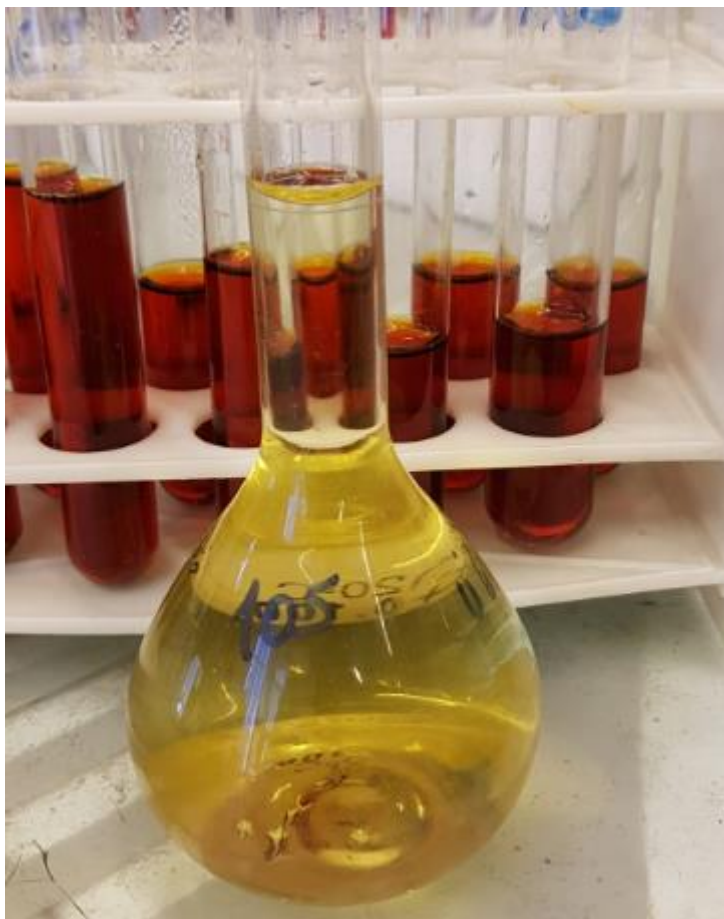


Figura 32. Imatge que mostra el color original de mostres sense dissoldre (darrere) i el color que tenen un cop són dissoltes (davant).

Aquesta vegada s'han obtingut resultats d'absorció entre 0 i 1 i, per tant, ja són lectures vàlides. S'ha obtingut el següent gràfic:

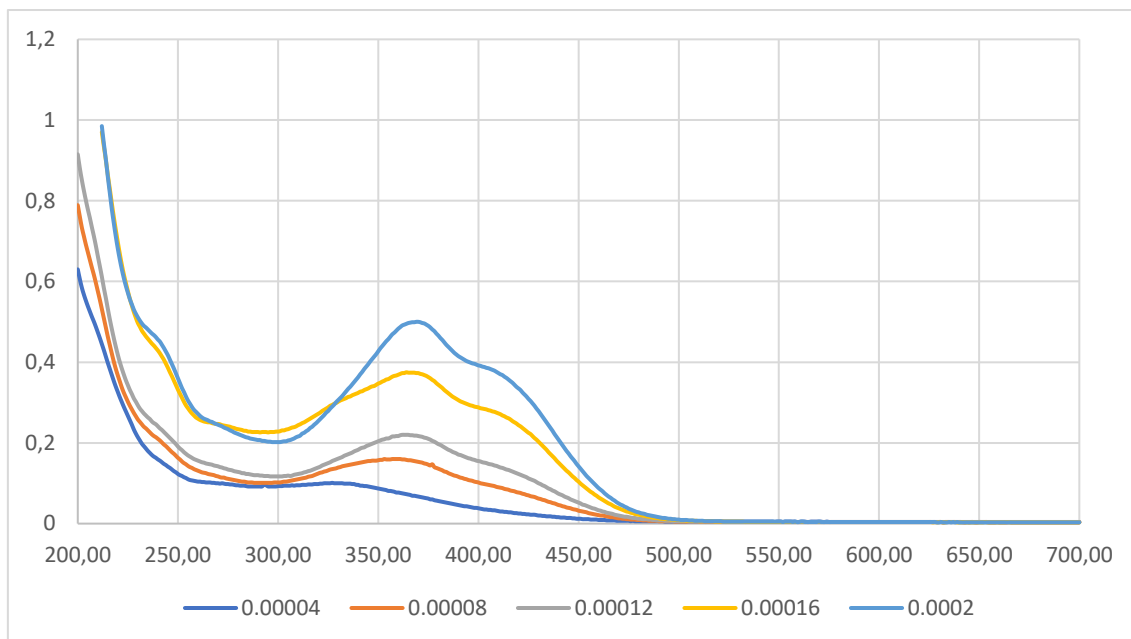


Figura 33. Gràfica de les lectures un cop les mostres de glucosa han sigut dissoltes.

S'observa que el valor màxim d'absorbància està situat a una longitud d'ona diferent a la qual segons la teoria havia d'estar en aquest tipus d'anàlisi (540nm). Com que segons literatura s'ha de seleccionar el valor màxim d'absorbància per fer un espectrofotometria, es seleccionarà aquest nou valor de longitud d'ona.

A més, s'ha dut a terme una espectrofotometria del llevat i el DNS per comprovar que el llevat no produeix interferències en la lectura ja que posteriorment aquest mètode ha d'analitzar dissolucions que contindran llevats.

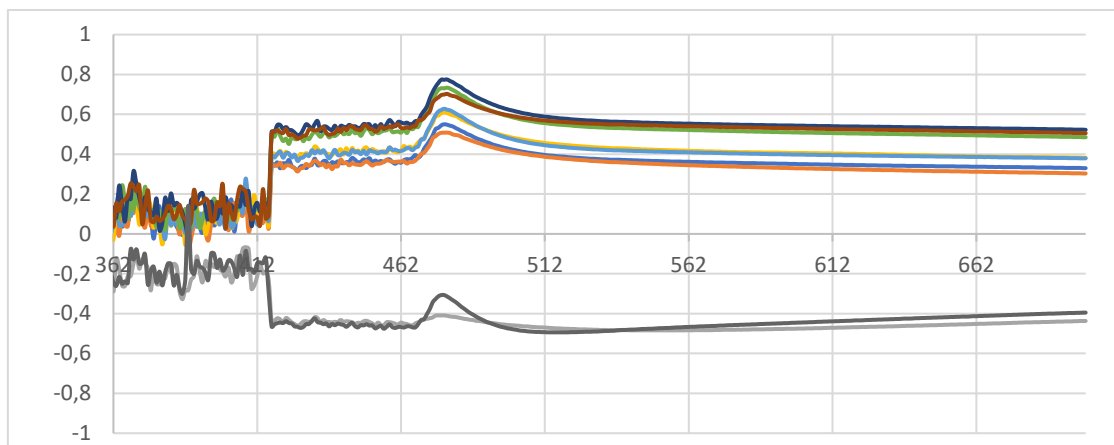


Figura 34. Gràfica de les lectures de les dissolucions de llevat.

Es pot observar que el llevat només causa interferències o “soroll” a partir de la longitud d’ona de 495 nm i inferiors. Per tant, la recta de calibratge caldrà fer-la amb valors d’ona superiors per poder analitzar les mostres que s’obtinguin en la fermentació.

Per evitar la zona de soroll provocat pel llevat, es selecciona la longitud d’ona més propera al màxim d’absorció. La longitud d’ona seleccionada és 496 nm i els resultats obtinguts són els següents:

Concentració g/L	Absorbància
0.00004	0.005
0.00008	0.006
0.00012	0.007
0.00016	0.01
0.00020	0.012

Taula 4. Lectures de l'absorbància de les mostres patrons de glucosa dissoltes.

Com que ja se sap que caldrà dissoldre les concentracions en una dissolució de 100 mL amb aigua destil·lada, s'utilitzen els valors inicials de les dissolucions abans d'aquesta última dissolució per facilitar els càlculs que es faran posteriorment. Caldrà recordar que totes les mostres abans de ser analitzades, hauran de ser dissoltes.

Concentració g/L	Absorbància
0.004	0.005
0.008	0.006
0.012	0.007
0.016	0.01
0.020	0.012

Taula 5. Lectures de l'absorbància de les mostres patrons de glucosa dissoltes simplificant els càlculs de la dissolució.

El gràfic de la recta calibratge queda així:

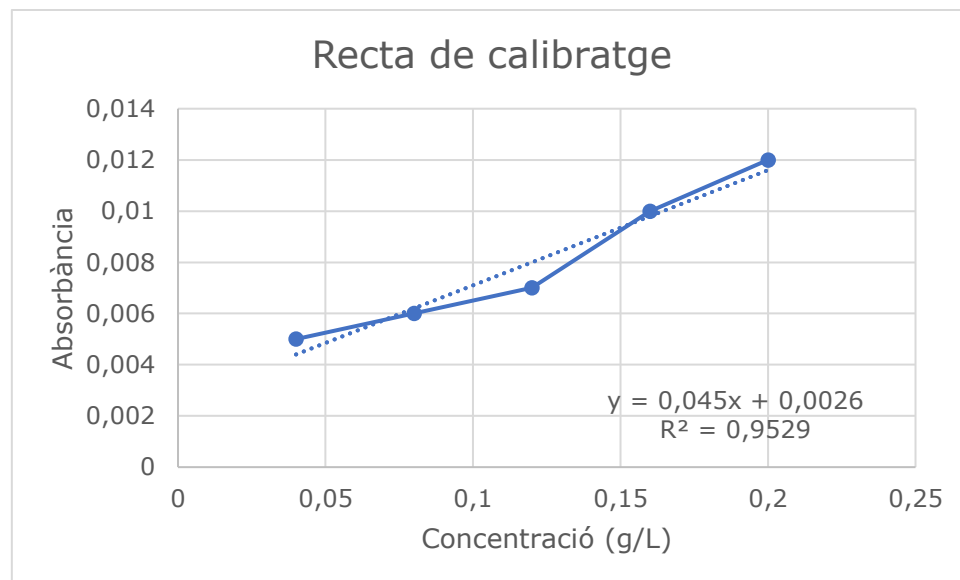


Figura 35. Gràfica de la primera recta de calibratge.

S'obté una recta de calibratge amb una alta linealitat on $R^2=0.9529$. La fórmula d'aquesta recta té la següent forma:

$$y = 0.045x + 0.0026$$

Equació 10. Primera recta de calibratge.

on el valor de y representa l'absorbància i la x la concentració de glucosa en g/L.

3.1.2.1.3 Discussió de resultats

Per dur a terme la recta de calibratge, s'han hagut de tenir en compte molts factors que intervenen en l'anàlisi de la concentració: des del rang de les concentracions fins a l'efecte del llevat.

Per les concentracions, s'han realitzat diferents proves fins obtenir el marge d'aquestes amb lectures d'absorbància viables i la preparació completa necessària per poder analitzar les mostres: caldrà dissoldre les mostres en 100 mL amb aigua.

A més, s'ha localitzat l'àrea on el llevat crea interferències i s'ha escollit un valor de longitud d'ona fora d'aquesta zona escollint la longitud d'ona 496 nm.

Finalment, després dels ajustos, s'ha obtingut la següent recta de regressió:

$$y = 0.045x + 0,0026$$

Equació 11. Primera recta de calibratge.

Seguint la llei de Lambert-Beer que descriu l'absorbància com:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Equació 12. Equació de la llei de Lambert-Beer [13].

s'observa que el pendent de la recta de calibratge és igual al coeficient d'extinció (ε) i la distància (l). Per tant, sempre que es treballi amb aquest tipus de reactiu, el pendent serà constant ja que aquests dos valors no varien.

3.1.2.2 Segon reactiu preparat

En aquest experiment, s'ha preparat un segon reactiu DNS per poder dur a terme els experiments del llevat encapsulat ja que amb el temps el primer reactiu s'ha degradat.

Com que es tracta del mateix producte, en comptes de realitzar de nou tot l'experiment detallat anteriorment, s'aprofita la recta anterior i es desplaça l'origen d'ordenades per adaptar-la al nou reactiu. S'utilitza una concentració coneguda i es compara el valor de l'absorbància obtingut anteriorment. La concentració seleccionada ha sigut 10 g/L ja que és la seleccionada per iniciar els experiments de fermentació.

3.1.2.2.1 Dades experimentals

Reactius consumits	
DNS	1.265 g
Tartrat sòdic potàssic	30.492 g
NaOH	2.147 g
Glucosa	5.057 g

Taula 6. Reactius consumits per obtenir la segona recta de calibratge.

Obtenint unes dissolucions amb les següents concentracions reals:

- NaOH: 25 mL de dissolució teòrica 2M

$$\frac{2.147 \text{ g NaOH}}{25 \text{ mL}} \cdot \frac{1 \text{ mol de NaOH}}{40 \text{ g NaOH}} \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 2.147 \text{ M NaOH}$$

- Tartrat sòdic potàssic: 50 mL de dissolució teòrica 600g/L

$$\frac{30.492 \text{ g de tartrat}}{0.05 \text{ L}} = 609.84 \text{ g/L de tartrat}$$

- Àcid 3,5-dinitrosalicílic: concentració teòrica de 0.05 g/mL

$$\frac{1.265 \text{ g de DNS}}{25 \text{ mL}} = 0.051 \text{ g/mL de DNS}$$

- Glucosa: 500 mL de dissolució teòrica 10 g/L

$$\frac{5.057 \text{ g}}{0.5 \text{ L}} = 10.084 \text{ g/L}$$

3.1.2.2.2 Resultats

Amb aquest nou reactiu el valor obtingut per aquesta concentració és de 0.034; mentre que en el primer cas era de 0.47978.

La nova recta de regressió a partir del resultats obtinguts segueix la següent fórmula:

$$y = 0.045x - 0.42$$

Equació 13. Segona recta de calibratge.

3.1.2.2.3 Discussió de resultats

Per obtenir la nova recta de calibratge, s'ha utilitzat una concentració de glucosa de 10 g/L. Les lectures d'absorbància per aquesta concentració estan situades dins de l'interval entre 0 i 1 i, per tant, són lectures òptimes per al seu ús com a referència.

Realitzats els càlculs pertinents, la nova recta de calibratge té la següent expressió:

$$y = 0.045x - 0.42$$

$$R^2 = 0,9529$$

Equació 14. Segona recta de calibratge.

3.2 Fermentació sense encapsular

3.2.1 Procediment

Aquest experiment té com a objectiu analitzar la reacció de fermentació del llevat sense encapsular.

Es prepara un solució de 10 g/L de glucosa on, posteriorment i sota agitació, s'afegeix el llevat.

L'experiment està sotmès a un bany tèrmic per mantenir una temperatura més o menys estable de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a un reactor *batch* d'1L de capacitat.

Es manté una agitació constant amb un agitador elèctric a una revolució de 200 rpm. Es selecciona aquesta velocitat per reduir l'efecte de la difusió en la reacció.

El temps inicial de la reacció considerat coincideix amb l'addició del llevat a la dissolució de glucosa. Les mostres s'han extret en intervals de temps regulars de 20 minuts excepte la primera mostra que ha sigut extreta 5 minuts després de l'inici de la reacció. Una última mostra ha sigut extreta al cap de 24 hores.

Temps d'extracció de mostres
0 minuts
5 minuts
25 minuts
45 minuts
65 minuts
85 minuts
105 minuts
125 minuts
145 minuts
24 hores

Taula 7. Temps d'extracció de les mostres.

3.2.1.1 Reactius i materials

Reactius	Materials
Reactiu DNS	Vasos de precipitats
Llevat	Matrassos aforats
Glucosa	Pipetes
Aigua destil·lada	Comptagotes
	Tubs d'assaig
	Espectrofotòmetre d'absorció
	Bany tèrmic

Taula 8. . Taula de reactius i materials utilitzats per estudiar la fermentació sense encapsulació.

La dissolució de glucosa ha sigut preparada en 1 L. Els càlculs previs per obtenir la concentració de 10 g/L són els següents:

$$500 \text{ mL} \cdot \frac{10 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL}} = 5 \text{ g de glucosa}$$

La concentració de llevat també va ser 10 g/L:

$$500 \text{ mL} \cdot \frac{10 \text{ g de llevat}}{1000 \text{ mL}} = 5 \text{ g de llevat}$$

L'espècie de llevat utilitzat és *Saccharomyces cerevisiae*.



Figura 36. Llevat utilitzat al laboratori.

3.2.1.2 Dades experimentals

Els valors reals de les concentracions de les dissolucions depenen de la quantitat real del reactiu que s'ha utilitzat:

Quantitats reals (g)	
Glucosa	5.024
Llevat	5.004

Taula 9. Reactius consumits per estudiar la fermentació amb llevat sense encapsular.

Les dissolucions tenen les següents concentracions reals:

$$\frac{5.024 \text{ g de glucosa}}{0.5 \text{ L}} = 10.048 \text{ g de glucosa}$$

$$\frac{5.004 \text{ g de glucosa}}{0.5 \text{ L}} = 10.008 \text{ g de glucosa}$$

3.2.2 Resultats

3.2.2.1 Evolució de la concentració de glucosa

Les mostres extretes s'ha analitzat amb el reactiu DNS i l'espectrofotòmetre. Un cop obtingudes les dades d'absorbància, s'utilitza la recta de calibratge per calcular les concentracions.

Temps d'extracció de mostres	Absorbància	Concentració (g/L)
0 minuts	0.079	10.048
5 minuts	0.091	10.133
25 minuts	0.086	10.078
45 minuts	0.077	9.978
65 minuts	0.049	9.667
85 minuts	0.046	9.633
105 minuts	0.037	9.533
125 minuts	0.041	9.578
145 minuts	0.034	9.500
24 hores	0.014	9.278

Taula 10. Lectures de l'absorbància de les mostres i la concentració calculada a partir de la recta de calibratge.

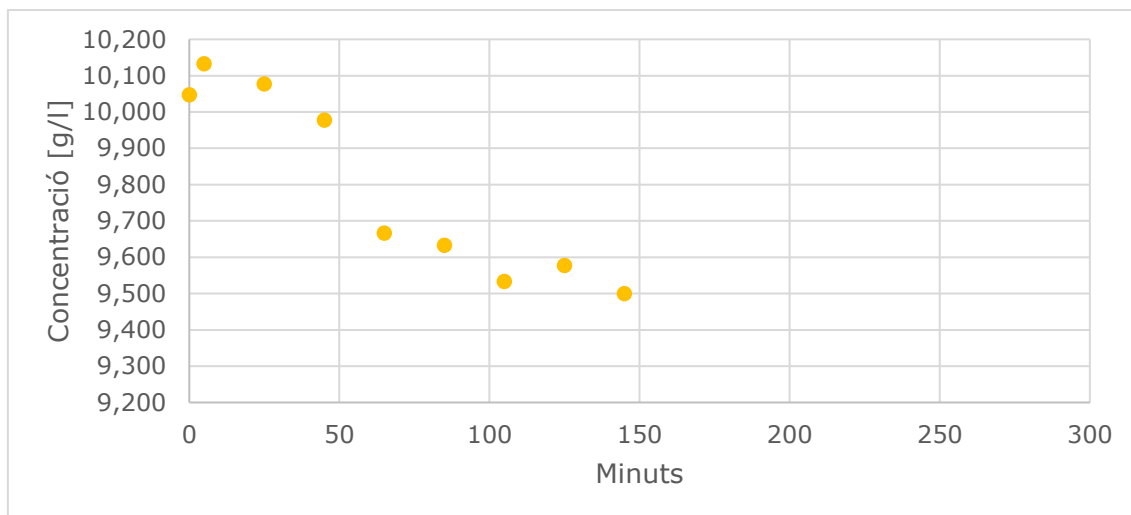


Figura 37. Gràfica de l'evolució de la concentració de la glucosa amb el llevat sense encapsular.

3.2.2.2 Velocitat de reacció

El gràfic de la velocitat de reacció és el següent:

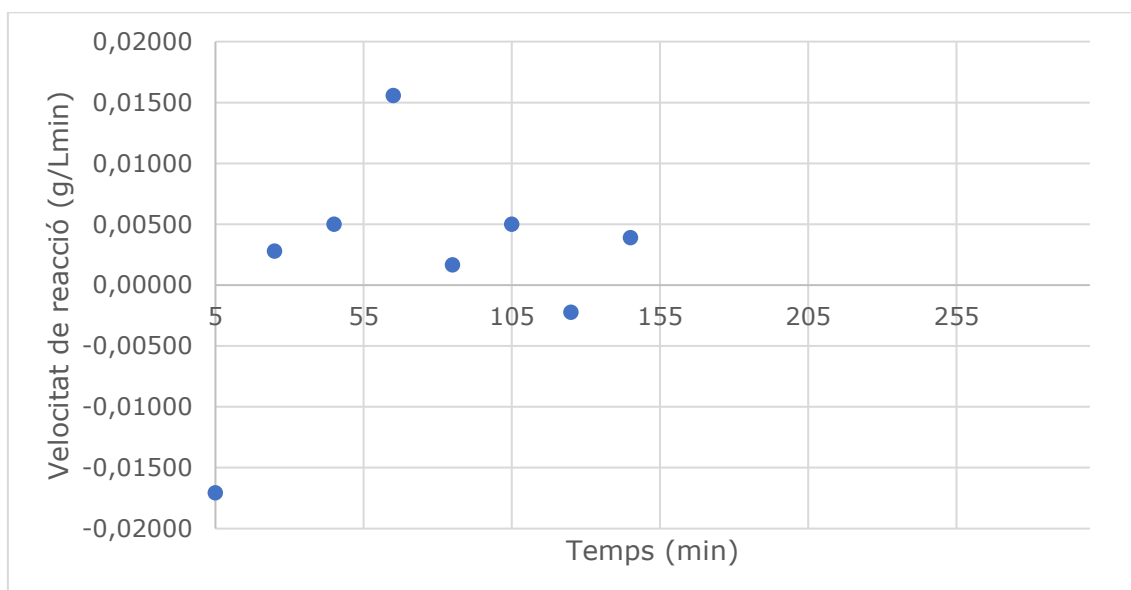


Figura 38. Gràfica de l'evolució de la velocitat de reacció de la glucosa i el llevat sense encapsular.

Es poden observar les tres fases que s'han descrit prèviament al marc teòric:

1. Increment fins a la velocitat de reacció màxima: aquest fase va des del primer instant fins al minut 65 que és on es registra la velocitat de reacció màxima. Es pot observar que, efectivament, utilitzar una concentració baixa de sucres ha provocat que aquesta fase sigui molt gran.
2. Un curt període de temps quasi estacionari: s'assoleix la velocitat màxima al minut 65 i ràpidament torna a caure. Aquesta fase és molt curta.
3. Una ràpida reducció de la velocitat de forma asimptòtica: aquesta última fase s'allarga en el temps tendint a 0. En 24 hores, no s'ha aconseguit assolir aquest valor.

3.2.2.3 Càlcul de la equació de reacció

Conegudes les concentracions en funció del temps, es pot utilitzar la fórmula següent extreta del marc teòric per analitzar si realment aquest model és adequat per a la modelització d'aquesta reacció:

$$[S]_t = [S]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

Equació 15. Equació de la velocitat de fermentació simplificada [49].

Cal recordar que aquesta equació no contempla la primera fase de la reacció. Per tant, aquesta equació es podrà aplicar a partir del minut 65 que serà considerat com a instant inicial per poder aplicar-la. Utilitzant els valors de les concentracions del minut 105 i 125, s'obtenen diferents constants de reacció:

Temps (min)	k (min ⁻¹)
105	8.8 · 10 ⁻⁴
125	8.1 · 10 ⁻⁴

Taula 11. Constants de reacció obtingudes.

La mitjana de les constants obtingudes serà la utilitzada per aplicar el model. A continuació, es mostra el gràfic amb les dades teòriques calculades amb aquesta fórmula i les dades reals:

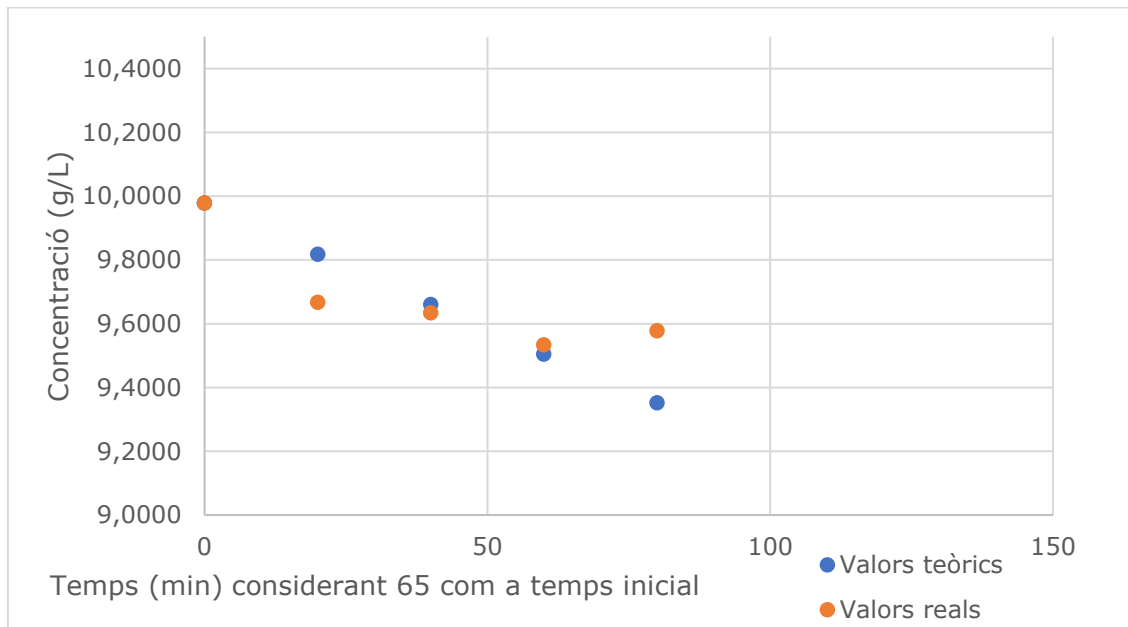


Figura 39. Gràfica comparativa dels valors teòrics i els valors experimentals per la reacció del llevat sense encapsular i la glucosa.

Durant els primers minuts, corresponents a la fase 2, els valors són similars. Però la fase 3 s'inicia abans i amb un valor de concentració més elevat que el proposat per aquesta equació.

3.2.3 Discussió de resultats

Aquest experiment ha analitzat el comportament d'una reacció de fermentació de concentració baixa.

S'han confirmat les fases definides al marc teòric les següents observacions:

- La fase 1 és molt llarga a causa de les baixes concentracions de glucosa.

- La fase 2 és puntual i no es crea una etapa quasi estacionària. La velocitat augmenta i decau ràpidament.
- La fase 3 és la més llarga en el temps. No s'arriba a assolir un valor pròxim a 0 en 24 hores.

La variació de la concentració de glucosa és de 0.77 g/L. Inicialment, la concentració és de 10.048 g/L i la final, de 9.278 g/L.

També s'ha comprovat la validesa del model proposat al marc teòric i s'ha observat que els valors teòrics només coincideixen amb els valors experimentals de la fase 2. En conseqüència, aquest model no serviria per modelitzar el comportament global de la reacció de fermentació. El principal inconvenient d'aquest model és que és molt simplificat i ignora moltes variables que poden afectar i modificar la velocitat de la reacció. Cal utilitzar un model més elaborat si es vol arribar a modelitzar aquesta reacció.

3.3 Encapsulació

La encapsulació s'ha fet amb alginat de sodi. La gelificació es produeix amb ions Ca^{2+} .



Figura 40. Imatge de l'alginat sòdic utilitzat al laboratori.

S'ha dut a terme dos passos diferents per realitzar les càpsules finals amb nucli de llevat.

Primer, s'ha determinat la tècnica de microencapsulació que s'utilitzarà per crear les micropartícules: emulsió o extrusió. També s'ha analitzat com els tensioactius afecten la formació de les microcàpsules i la seva estructura. Aquests experiments s'han realitzat sense crear nuclis de llevat.

En segon lloc, s'han produït dotze tipus diferents de microcàpsules variant la concentració d'alginat, llevat i tensioactius.

3.3.1 Encapsulació sense nucli

3.3.1.1 Determinació de la tècnica

Les tècniques amb les quals s'ha experimentat per crear les microcàpsules són l'emulsió i l'extrusió.

Com s'ha explicat anteriorment, la diferència clau entre les dues és el tipus de gelificació que utilitzen: interna, en el cas de l'emulsió, i externa, en el cas de l'extrusió.

3.3.1.1.1 Reactius i materials

Reactius	Materials
Alginat de sodi	Gots de precipitats
Aigua destil·lada	Matrassos aforats
Clorur de calci	Xeringa
	Bureta
	Reactor <i>Batch</i>
	Agitador magnètic
	Agitador elèctric

Taula 12. Taula de reactius i materials utilitzats per realitzar l'encapsulació.

La dissolució d'alginat s'ha preparat en 2% en pes i la de clorur de calci en 2.5% en pes [25]. Les quantitats necessàries en cada reactiu per obtenir les dissolucions són les següents:

Reactius	Quantitat de reactiu (g)	mL de dissolució preparada
Alginat de sodi	2.5	250
Clorur de calci	12.525	500

Taula 13. Quantitats teòriques de reactiu per produir càpsules sense llevat.

En el primer instant, l'alginat no es dissol completament en l'aigua destil·lada. Forma grans grumolls rodejats per gel que no permeten que l'interior s'impregni d'aigua. Per aconseguir que la dissolució d'alginat es mescli de forma homogènia, ha sigut necessari deixar-lo 24 hores en repòs i dins de la nevera per evitar que es degradi. Un cop passat aquest temps, els grumolls han desaparegut i s'ha aconseguit una mescla homogènia.

3.3.1.1.2. Procediment i resultats

En les primeres dues experiències s'ha intentat realitzar la tècnica d'emulsió. S'ha col·locat la dissolució d'alginat en un reactor *batch* amb agitació.

En el primer cas, la agitació és de 250 rpm. Es fa una addició regular de 0,5 mL de la dissolució de CaCl_2 cada 10 minuts des d'una bureta. Com a resultat, no s'han obtingut microcàpsules, sinó que s'ha format una bola al voltant de la vara d'agitació. En la segona experiència, s'ha augmentat la velocitat d'agitació a 400 rpm, però els resultats han sigut els mateixos.

A la tercera experiència, s'ha canviat a la tècnica d'extrusió. S'ha col·locat la dissolució de CaCl_2 al reactor i la dissolució d'alginat s'ha addicionat seguint el mateix patró que en les experiències anteriors d'emulsió. Aquest cop, s'han format càpsules d'alginat transparent d'una mida regular d'aproximadament 2 mm de diàmetre. Aquestes, un cop extretes del medi aquós, perden l'aigua que ha quedat atrapada dins de l'estructura durant la gelificació i el seu diàmetre es redueix a 1 mm.

Les càpsules són transparents i fàcilment deformables per forces externes.

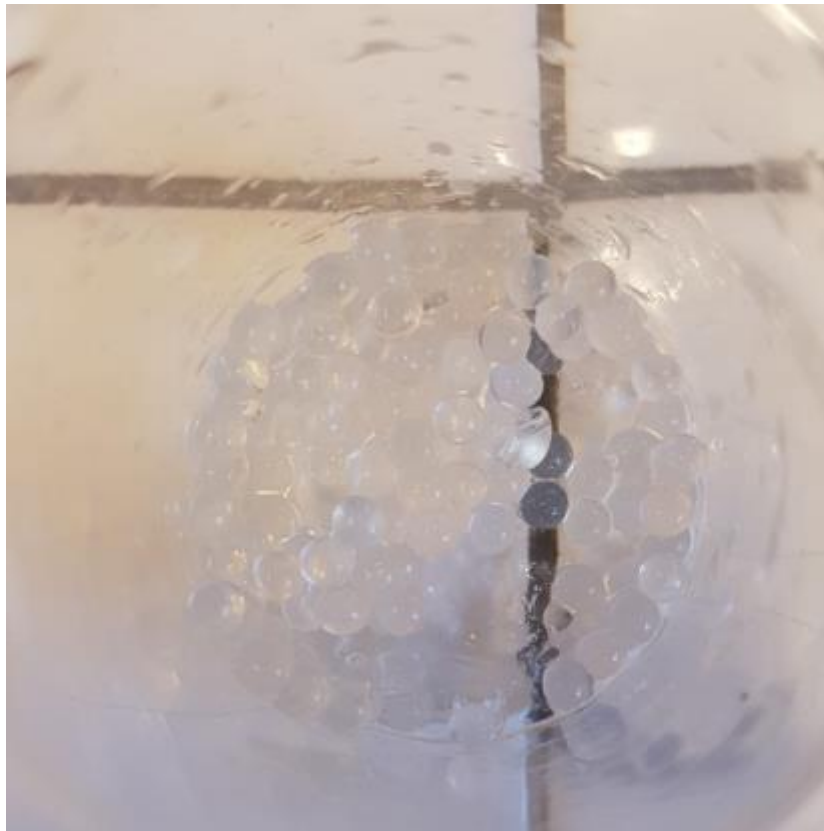


Figura 41. Primeres càpsules obtingudes utilitzant l'extrusió.

3.3.1.1.3 Discussió de resultats

La tècnica de l'emulsió és una tècnica que requereix de recursos i preparació més elaborades que les utilitzades durant la primera i la segona experiència. Aquestes són la causa de la no formació de microcàpsules durant el procés.

La tècnica de l'extrusió és una tècnica que requereix de menys elaboració o sistemes tan elaborats respecte l'anterior. Això permet crear càpsules de forma més barata i simple, però la mida de les càpsules depèn del material que hagi abocat la gota de l'alginat. Això

és a causa que cada gota addicionada ha gelificat de manera que s'obté una càpsula per gota.

S'ha decidit continuar amb la tècnica de l'extrusió fent diferents canvis en el sistema per aconseguir càpsules més petites i estables.

3.3.1.2 Ús de tensioactius

Els tensioactius, que també s'anomenen surfactants o agents de superfície activa, són espècies químiques amb una naturalesa o estructura polar-no polar, és a dir, un extrem de la seva estructura pot tenir polaritat i l'altre extrem, no [54].

Es col·loquen en la interfase per formar una capa monomolecular que canvia el valor de la tensió superficial de la substància on ha estat addicionada. Un altre nom que també poden rebre és el d'emulgent o emulsionants ja que permeten aconseguir o mantenir una emulsió [54].

Quan les solucions de tensioactius es col·loquen en forma de capa monomolecular en la superfície entre les fases hidrofíliques i hidrofòbiques prenen un caràcter actiu. Aquesta ubicació "evita" el trànsit de molècules des de la superfície fins a l'interior de líquid en la cerca d'un estat d'energia menor, és a dir, es disminueix la tensió superficial [54].

Les propietats generals i comportament dels agents tensioactius depenen de les característiques dels dos grups que conformen la molècula (grup hidròfil i lipòfil); és a dir, la contraposició entre aquestes dos grups de la seva pròpia molècula i l'equilibri entre ells dona al compost les seves propietats actives. El grup hidròfil exerceix

un efecte solubilitzant i tendeix a portar a la molècula a dissolució completa. El grup hidròfob, en canvi, causa la seva insolubilitat i tendeix a contrarestar la tendència de l'altre. Un equilibri adequat entre els dos grups provoca que la substància no es dissolgui completament o es quedi sense dissoldre. Els grups hidròfils s'orienten cap a la fase aquosa, mentre que els hidròfobs cap a la no aquosa o la fase vapor [54].

La classificació dels tensioactius es basa en el seu poder de dissociació en presència d'un electròlit i de les seves propietats fisicoquímiques [54].

Hi ha dues categories principals: iònics i no-iònics [55].

Els iònics tenen forta afinitat per l'aigua. Segons la càrrega que tingui la part polar seran: aniònics (càrrega negativa), catiònics (càrrega positiva) i amfòters. Durant el projecte s'utilitzarà el lauril sulfat, un tensioactiu aniònic [55].

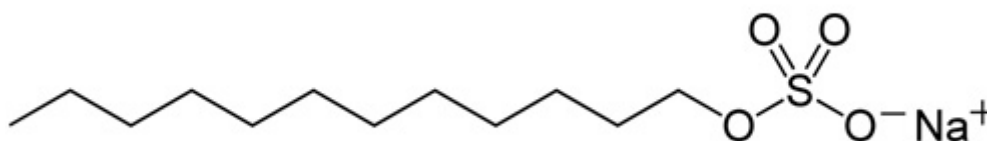


Figura 42. Estructura del lauril sulfat [56].

Els no iònics són tensioactius el grup hidròfil dels quals no posseeix càrrega elèctrica en solució aquosa perquè no es pot dissociar. Molts tensioactius no iònics podrien ser classificats com èters o alcohols. El

tensioactiu utilitzat d'aquest tipus durant l'experiment serà el polietilenglicol [55].

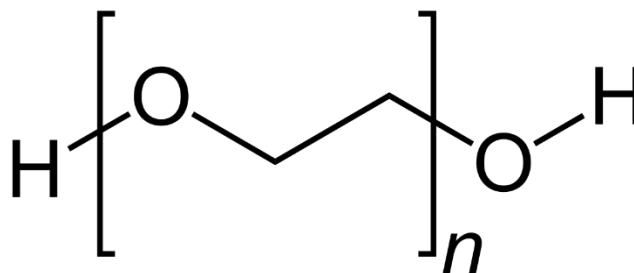


Figura 43. Estructura del polietilenglicol [57].

En aquestes experiències, s'estudiarà els efectes dels tensioactius descrits en càpsules formades amb la tècnica d'extrusió. S'experimenta amb diferents concentracions de tensioactiu mantenint les concentracions constants d'alginat de sodi i clorur de calci respecte a l'apartat anterior. També s'estudiarà com afecta que els tensioactius addicionin a la dissolució de l'alginat o a la dissolució del clorur de calci.

3.3.1.2.1 Reactius i materials

Reactius	Materials
Alginat de sodi	Gots de precipitats
Aigua destil·lada	Matrassos aforats
Clorur de calci	Xeringa de diàmetre gran
Lauril sulfat	Xeringa de diàmetre petit
Polietilenglicol	Bureta
	Reactor <i>Batch</i>
	Agitador elèctric
	Agitador magnètic

Taula 14. Taula de reactius i materials utilitzats per realitzar l'encapsulació amb tensioactius.

Les solucions d'alginat i clorur de calci s'han preparat igual que en el cas anterior.

Per dur a terme les experiències amb els tensioactius, aquests han sigut mesclats per obtenir concentracions de 2% i 10%.

A més, aquesta vegada es compta amb xeringues de diferents diàmetres de sortida de l'alginat per analitzar com aquest canvi de diàmetre afecta a la mida de les càpsules.



Figura 44. Xeringa de diàmetre major [58].



Figura 45. Xeringa de diàmetre menor [59].

3.3.1.2.2 Procediment i resultats

Tots els experiments realitzats imiten el mètode d'extrusió descrit en l'apartat anterior. S'ha col·locat la dissolució de CaCl_2 en el reactor

Batch. La dissolució és agitada a 400 rpm i la dissolució d'alginat de sodi s'addiciona de forma regular.

El primer experiment permet comparar l'efecte de les dues concentracions de lauril sulfat dissolt en l'alginat. Es realitzen dues diferents tandes de càpsules per a cada agulla a la concentració de 2% en pes de lauril sulfat en la dissolució d'alginat.



Figura 46. Imatge de les càpsules obtingudes amb un 2% en pes de lauril sulfat (esquerra) i les càpsules sense tensioactius (dreta).

Els resultats amb les dues xeringues han sigut similars.

A la figura 46, s'observen les esferes obtingudes l'apartat anterior, transparents, i les càpsules amb el 2% de lauril sulfat, blanques. Es pot observar que el canvi més important és el color que el lauril sulfat li dona ara a la càpsula (el reactiu inicial de laurils sulfat té forma de pols blanca).

S'ha repetit el procediment amb la concentració de 10% de lauril sulfat. En aquest cas, s'han obtingut càpsules de diferents característiques en funció de la xeringa utilitzada. Per la xeringa gran, es formen càpsules

de diferents mides que van des del 2 mm a diàmetres molt inferiors. En el cas de la xeringa petita, es formen càpsules amb formes irregulars i algunes de les addicions d'alginat no acaben formant càpsules.



Figura 47. Imatge de les càpsules obtingudes amb un 10% en pes de lauril sulfat utilitzant la xeringa gran.

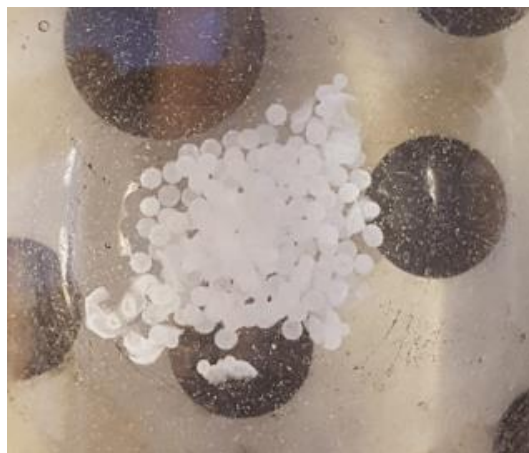


Figura 48. Imatge de les càpsules obtingudes amb un 10% en pes de lauril sulfat utilitzant la xeringa petita.

També s'observa que les càpsules són més rígides que les obtingudes sense tensioactiu i perden menys aigua quan s'assequen.

El segon experiment repeteix la metodologia practicada amb el lauril sulfat, però utilitzant el polietilenglicol com a tensioactiu.

Pel cas de la concentració de 2% en pes de polietilenglicol, les càpsules obtingudes són de la mateixa mida que les obtingudes en el cas sense tensioactiu sense diferències entre les xeringues. Pel cas del 10% de concentració, la xeringa gran obté càpsules de la mateixa mida que les anteriors i la petita aconsegueix reduir la mida.

En el tercer i quart experiment, els tensioactius han sigut addicionats a la dissolució de CaCl_2 , en comptes de l'alginat. De la mateixa manera que als experiments anteriors, la concentració dels tensioactius ha sigut del 2% i del 10%. Les càpsules resultants d'aquest experiment han resultat ser iguals que en el cas en què no s'han utilitzat tensioactius.

3.3.1.2.3 Discussió de resultats

El tensioactiu que més efecte ha tingut en la formació de les càpsules ha sigut el lauril sulfat quan es barreja amb la concentració d'alginat. Aquest ha permès obtenir unes càpsules més petites i resistents que en la resta de casos, sobretot si es treballa amb la concentració al 10% en pes.

El polietilenglicol pràcticament no ha provocat canvis en les càpsules. Tampoc ho ha fet addicionar els tensioactius a la dissolució de CaCl_2 .

La diferència de l'efecte dels dos tensioactius està provocada per la seva estructura i com aquesta intervé en el procés de gelificació. Mentre el polietilenglicol és un tensioactiu no iònic, el lauril sulfat és un tensioactiu aniònic, és a dir, té càrrega negativa, igual que l'alginat. La gelificació té lloc entre un catió, el calci, i un anió, l'alginat. Com que el lauril sulfat és una molècula d'igual càrrega que l'alginat és capaç d'interferir en el procés de gelificació modificant la càpsula resultant

final. És a dir, el lauril sulfat redueix la reticulació polimèrica que es dona durant la gelificació, la unió de cadenes d'alginat, saturant els cations de calci i, a més, la resta de cadena liofílica del tensioactiu dificulta l'ordenació de les cadenes d'alginat [60].



Figura 49. Representació de la gelificació de l'alginat en presència de lauril sulfat. L'alginat està representat com a cadenes polimèriques; l'ió calci, pels rombes; i el lauril sulfat, per les rodones amb cua [60].

Per tant, el tensioactiu que s'utilitzarà en els següents experiments serà el lauril sulfat addicionant-lo a la dissolució d'alginat ja que és el que produeix més canvis en l'estructura.

En tot cas, no s'ha aconseguit que les càpsules siguin de mida microscòpica. És a dir, no són microcàpsules, sinó càpsules.

3.3.2 Encapsulació amb nucli de llevat

Un cop determinada la tècnica d'encapsulació i el tensioactiu a utilitzar, es procedeix a encapsular el llevat.

3.3.2.1 Procediment i resultats

S'han creat 12 tipus diferents de càpsules variant la concentració del llevat, de l'alginat i del lauril sulfat a partir de 7 dissolucions diferents.

3.3.2.1.1 Reactius i material

Reactius	Materials
Alginat de sodi	Gots de precipitats
Aigua destil·lada	Matrassos aforats
Clorur de calci	Bureta
Lauril sulfat	Reactor <i>Batch</i>
Llevat	Agitador elèctric
	Agitador magnètic
	Xeringa de doble diàmetre

Taula 15. Taula de reactius i materials utilitzats per realitzar l'encapsulació del llevat.

3.3.2.1.1.1 Reactius

A part de la dissolució de CaCl_2 al 2.5% en pes, com s'ha dit anteriorment s'han preparat 7 dissolucions diferents per preparar les càpsules. Aquestes dissolucions es poden dividir en dues classes: la primera on la dissolució conté llevat i la segona, alginat i tensioactiu.

Dissolucions de llevat		
Nom de la dissolució	Concentració de llevat (% en pes)	
A	1	
B	5	
C	10	
Dissolucions d'alginat		
Nom de la dissolució	Concentració d'alginat (% en pes)	Concentració de lauril sulfat (% en pes)
1	1	0
2	2	0
3	2	2
4	2	10

Taula 16. Llistat de les dissolucions preparades per encapsular llevat.

S'han preparat 50 mL de cada dissolució.

3.3.2.1.1.2 Xeringa de doble diàmetre

Per poder addicionar el nucli de llevat dins de les càpsules d'alginat, s'ha d'aconseguir que la gota d'alginat que cau a la dissolució que conté els cations ja tingui aquest nucli al seu interior.

Això és perquè, tal com s'ha explicat anteriorment, cada gota d'alginat que cau a la mescla amb cations, quan entra amb contacte amb aquests, inicia el procés de gelificació externa. Les càpsules que s'obtenen són, llavors, les gotes que s'han gelificat. El nucli de llevat s'ha d'addicionar a la gota d'alginat mentre aquesta es forma.

L'eina utilitzada per aconseguir això era una agulla de xeringa amb dos diàmetres concèntrics.



Figura 50. Esquema dels diàmetres de sortida de la xeringa.

Seguint l'esquema de la figura 50 que representa la punta de l'agulla, la dissolució amb llevat surt per la zona marcada amb el color taronja, mentre que la que conté alginat surt per la blava. Així s'aconsegueix que la gota d'alginat envolti una gota de llevat que es forma al seu interior.



Figura 51. Imatge del sistema d'extrusió utilitzat al laboratori.

La figura 51 mostra el muntatge final que pren aquesta eina. La xeringa situada verticalment conté el llevat i es comunica amb la zona taronja. La xeringa horitzontal conté l'alginat i comunica amb la zona blava. S'han de pressionar simultàniament les dues xeringues perquè els dos reactius sortin alhora.

Aquesta xeringa té uns diàmetre de sortida molt petits. El temor que s'obstruís l'instrument és el motiu pel qual la concentració de les dissolucions escollides per fer aquesta producció de càpsules és inferior o igual a les utilitzades anteriorment.

3.3.2.1.2 Formació de les càpsules

Utilitzant la xeringa de doble diàmetre per formar les gotes, aquestes s'han deixat caure en un got de precipitats que conté la dissolució de CaCl_2 .



Figura 52. Mostra de les càpsules de llevat.

La mostra correspon a les càpsules formades en una dissolució d'alginat que no conté lauril sulfat. El color blanc que es pot veure en el seu interior és la dissolució de llevat. Així que, finalment, s'ha aconseguit encapsular llevat.

A la mostra fotogràfica es poden observar les càpsules obtingudes per un sol tipus de càpsules, però tenen diferents colors. La causa és que el mètode mecànic és instrumentat de forma manual i un petit canvi en la força aplicada en l'addició d'un dels components d'una càpsula a una altra provoca grans diferències en les mides dels nuclis de llevat.

Els dotze tipus de càpsules s'han format de manera separada i combinant de la següent manera les set dissolucions preparades:

1A	2A	3A	4A
1B	2B	3B	4B
1C	2C	3C	4C

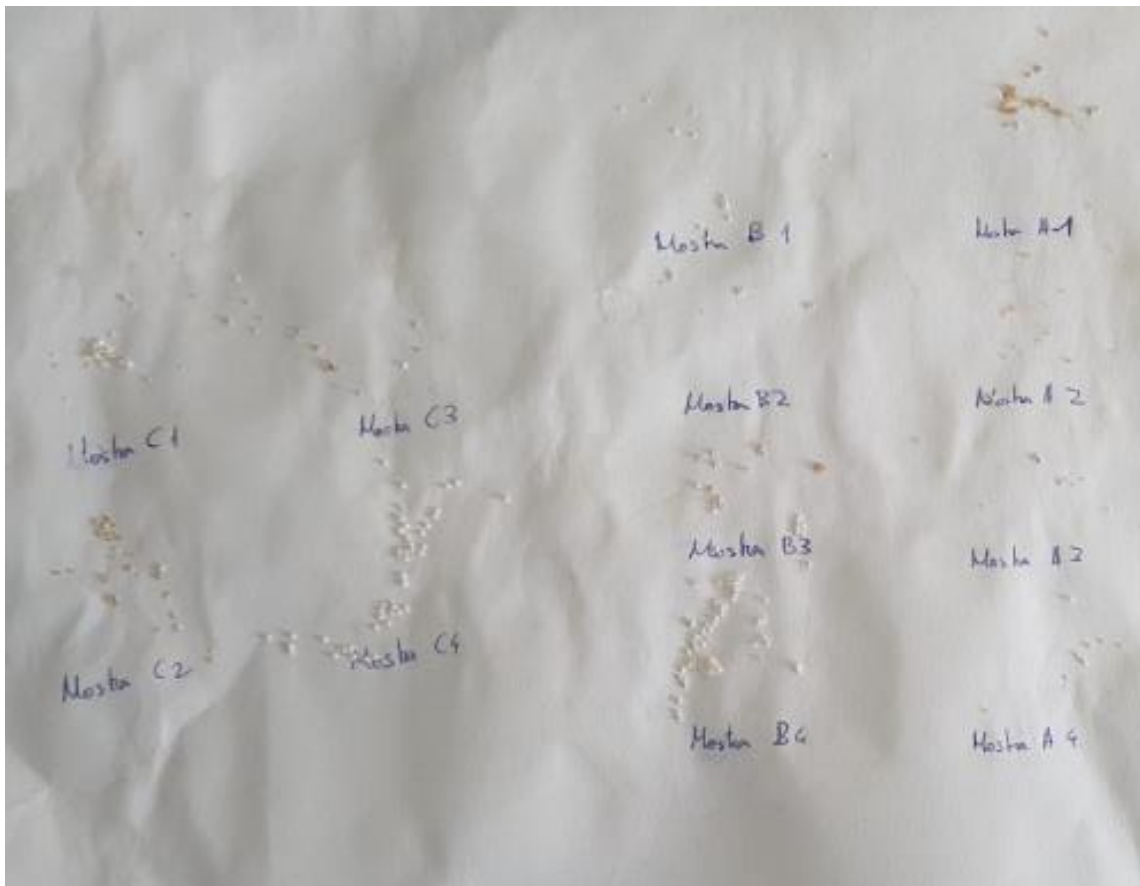


Figura 53. Imatge de les diferents mostres obtingudes de càpsules de llevat.

En aquestes càpsules es poden observar les següents característiques:

- Les càpsules del tipus "1" són molt irregulars en forma i mida. La majoria de gotes no arriben a formar càpsula.
- Les càpsules de tipus "C" són les més estables i regulars de mida. També són les més resistents.

- Les càpsules "A" i "B" són difícils de formar. En molts casos, l'alginat no aconsegueix envoltar el llevat i no es forma la càpsula. Només amb les variants "3" i "4" s'obtenen càpsules de qualitat.

3.3.2.3 Discussió de resultats

A partir de les càpsules obtingudes s'ha arribat a les següents conclusions:

- Concentracions baixes de llevat provoquen que les càpsules siguin difícils de formar. Només les càpsules del 10% en pes de llevat han format càpsules totalment estables i regulars.
- La presència de tensioactius augmenta la regularitat i estabilitat de les càpsules. De fet, dins de cada grup de concentració de llevat (A, B o C), les càpsules amb lauril sulfat destaquen respecte de la resta, és a dir, les càpsules de tipus "4" són millors que la resta de càpsules dins del grup "A", dins del grup "B" i dins del grup "C".
- La concentració d'alginat a l'1% en pes (tipus de càpsula "A") és massa petita per crear càpsules estables amb qualsevol concentració de llevat.

Per dur a terme la fermentació de les càpsules, descrit al pròxim apartat, s'han seleccionat 3 tipus diferents de càpsules per produir-les en major quantitat i realitzar la fermentació. Per poder dur a terme una comparació òptima entre els diferents resultats, s'opta per escollir 3 tipus de càpsules que tinguin en comú una de les dissolucions utilitzades. D'aquesta manera, es pot analitzar com influencia la variable que canvia sense la interferència de l'altra.

A la vista dels resultats, els tipus escollits han sigut 2C, 3C i 4C. S'han produït una quantitat major d'aquestes de forma separada replicant el mètode utilitzant en aquest apartat i amb les solucions utilitzades per fer les càpsules a comparar.

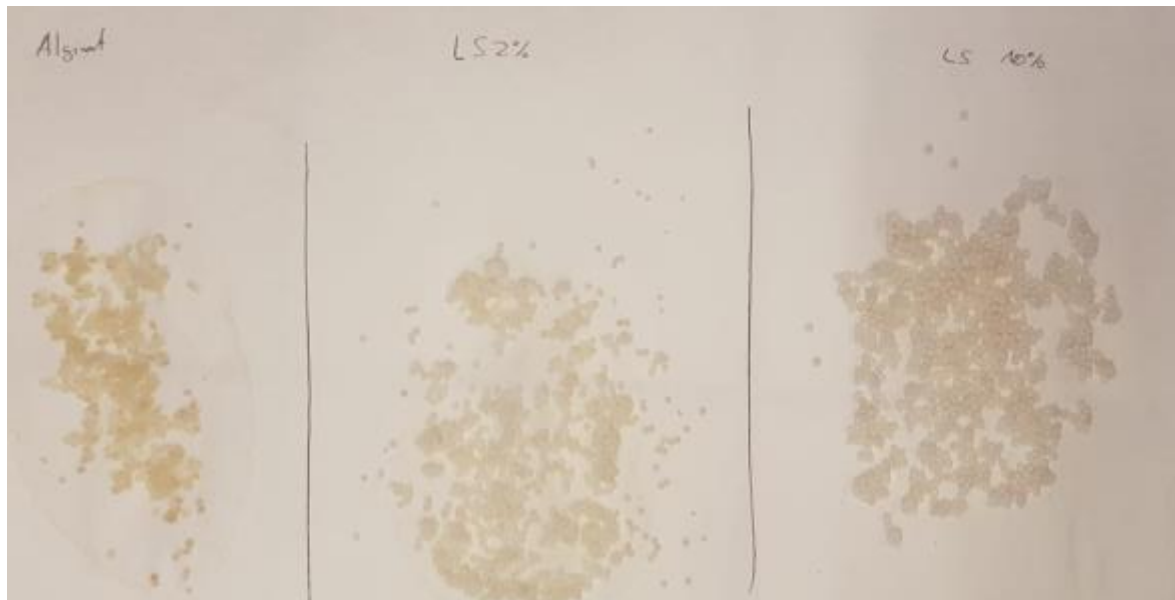


Figura 54. Càpsules de llevat produïdes per dur a terme la fermentació.

3.4 Fermentació de les càpsules

En aquest apartat s'analitzarà la reacció de fermentació utilitzant llevat encapsulat en les càpsules 2C, 3C i 4C.

3.4.1 Procediment

Es duran a terme 3 fermentacions per separat, una per cada tipus de càpsula.

Les condicions de fermentació seran les mateixes que es van utilitzar per la fermentació de llevat sense encapsular:

S'ha preparat una solució de 10 g/L de glucosa per a cada tipus on, posteriorment i sota agitació, s'ha afegit el llevat encapsulat.

L'experiment està sotmès a un bany tèrmic per mantenir una temperatura més o menys estable de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a un reactor *Batch* d'1L de capacitat.

Es manté una agitació constant amb un agitador elèctric a una revolució de 200 rpm.

El temps inicial de la reacció considerat coincideix amb la addició de les càpsules a la dissolució de glucosa. Les mostres s'han extret en intervals de temps regulars de 20 minuts, excepte la primera mostra, que s'ha extret 5 minuts després de l'inici de la reacció, però en aquest cas s'han pres dues mostres més amb aquests intervals. Una última mostra ha sigut extreta al cap de 24 hores.

Temps d'extracció de mostres
0 minuts
5 minuts
25 minuts
45 minuts
65 minuts
85 minuts
105 minuts
125 minuts
145 minuts
165 minuts
185 minuts
24 hores

Taula 17. Temps d'extracció de les mostres pel llevat encapsulat.

Les mostres han sigut analitzades amb el segon reactiu DNS que s'havia preparat per causa de la degradació del primer seguint el mètode descrit a l'apartat 3.1 on la recta de calibratge té la següent forma:

$$y = 0.045x - 0.42$$

3.4.1.1 Reactius i materials

Reactius	Materials
Reactiu DNS	Vasos de precipitats
Llevat encapsulat tipus 2C, 3C i 4C	Matrassos aforats
Glucosa	Pipetes
Aigua destil·lada	Comptagotes
	Tubs d'assaig
	Espectrofotòmetre d'absorció
	Bany tèrmic

Taula 18. Taula de reactius i materials utilitzats per estudiar la reacció de la fermentació mitjançant càpsules.

La dissolució de glucosa ha sigut preparada en 1 L. Els càlculs previs per obtenir la concentració de 10 g/L són els següents:

$$500 \text{ mL} \cdot \frac{10 \text{ g de glucosa}}{1000 \text{ mL}} = 5 \text{ g de glucosa}$$

3.4.1.1.1 Dades reals

Les concentracions inicials de glucosa per a casa tipus varia en funció de la quantitat real de reactiu que s'ha agafat:

Tipus de càpsula	g reals de glucosa	Concentració real de glucosa (g/L)
2C	5.057	10.114
3C	5.097	10.194
4C	5.042	10.084

Taula 19. Reactius consumits per estudiar la fermentació amb llevat encapsulat i la concentració de glucosa en dissolució.

3.4.2 Resultats

3.4.2.1 Càpsules 2C

L'extracció de les mostres, la fermentació, i la reacció amb el DNS es fa simultània, excepte l'última que es fa a posteriori ja que és al cap de 24 hores des de l'inici de la reacció. L'aspecte de les mostres extretes és el que es mostra en la següent figura.

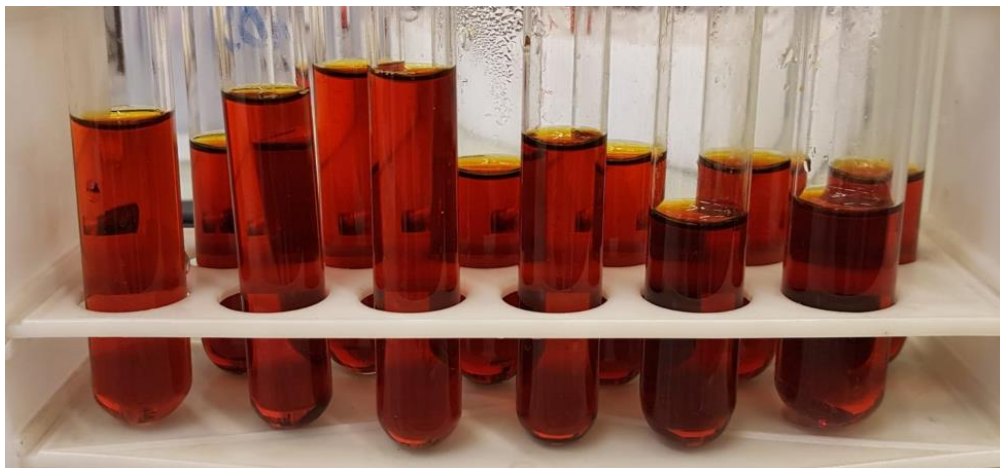


Figura 55. Mostres extretes durant la fermentació mitjançant les càpsules 2C

Ja en aquest pas es pot observar que el to o intensitat del color no varia de forma pronunciada en el temps.

L'anàlisi de les mostres per espectrofotometria proporciona les següents lectures:

Temps (min)	Absorbància	Concentració de glucosa (g/l)
1440	0,033	10,067
185	0,016	9,689
165	0,015	9,667
145	0,031	10,022
125	0,025	9,889
105	0,021	9,800
85	0,028	9,956
65	0,022	9,822
45	0,026	9,911
25	0,023	9,844
5	0,026	9,911
0	0,035	10,114

Taula 20. Lectures de l'absorbància de les mostres i la concentració calculada a partir de la recta de calibratge utilitzant les càpsules 2C.

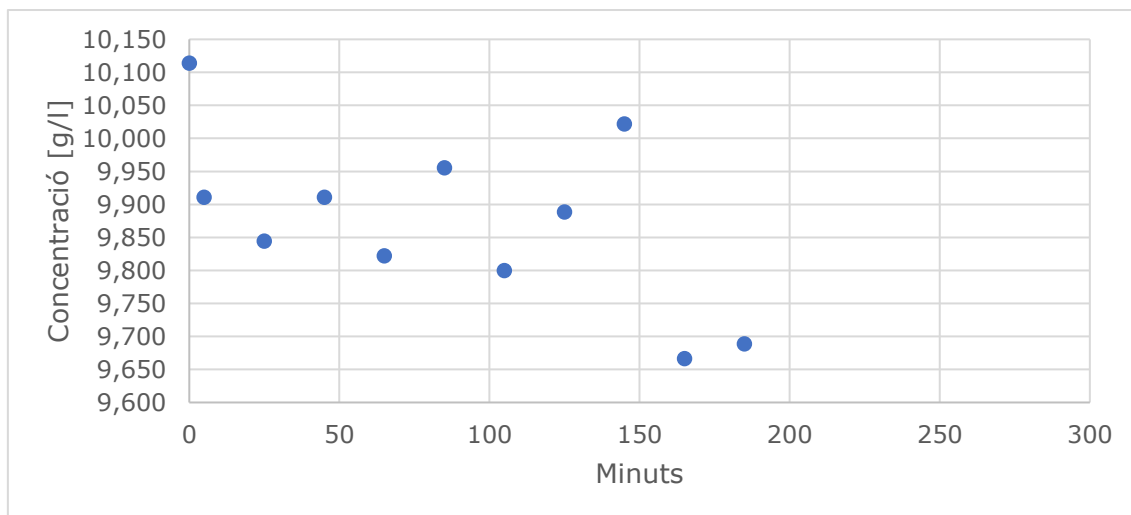


Figura 56. Gràfica que representa l'evolució de la concentració de glucosa per la fermentació de les càpsules 2C.

Es pot observar que, tot i que inicialment sembla que la quantitat de glucosa es redueix fins a una disminució del 0.5 g/L de concentració, és a dir, sembla que la fermentació està tenint lloc, la concentració final és pràcticament igual a la inicial.

La velocitat de reacció pren aquests valors:

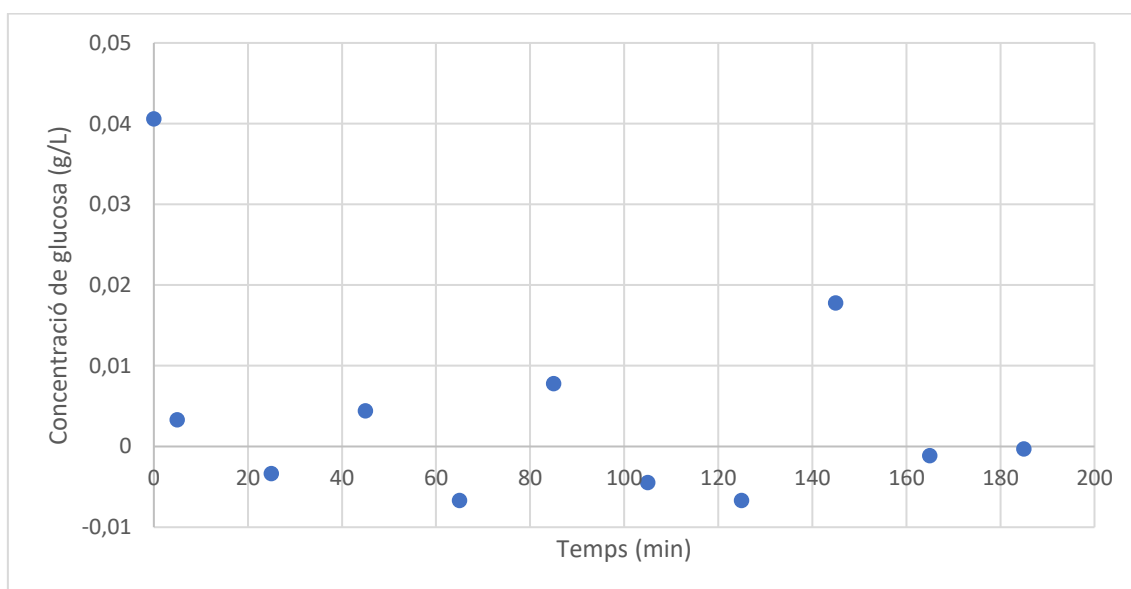


Figura 57. Gràfica de la velocitat de reacció de la càpsula 2C.

Es pot observar que, tot i que inicialment la velocitat és de $0.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, ràpidament cau a valors aproximats de 0; cosa que provoca que el sucre torni a ser alliberat a la dissolució externa de la càpsula.

3.4.2.2 3C

Els resultats obtinguts per espectrofotometria són els següents:

Temps (min)	Absorbància	Concentració de glucosa (g/l)
1440	0,043	10,289
185	0,035	10,111
165	0,034	10,089
145	0,036	10,133
125	0,032	10,044
105	0,031	10,022
85	0,035	10,111
65	0,032	10,044
45	0,033	10,067
25	0,03	10,000
5	0,028	9,956
0	0,039	10,194

Taula 21. Lectures de l'absorbància de les mostres i la concentració calculada a partir de la recta de calibratge utilitzant les càpsules 3C.

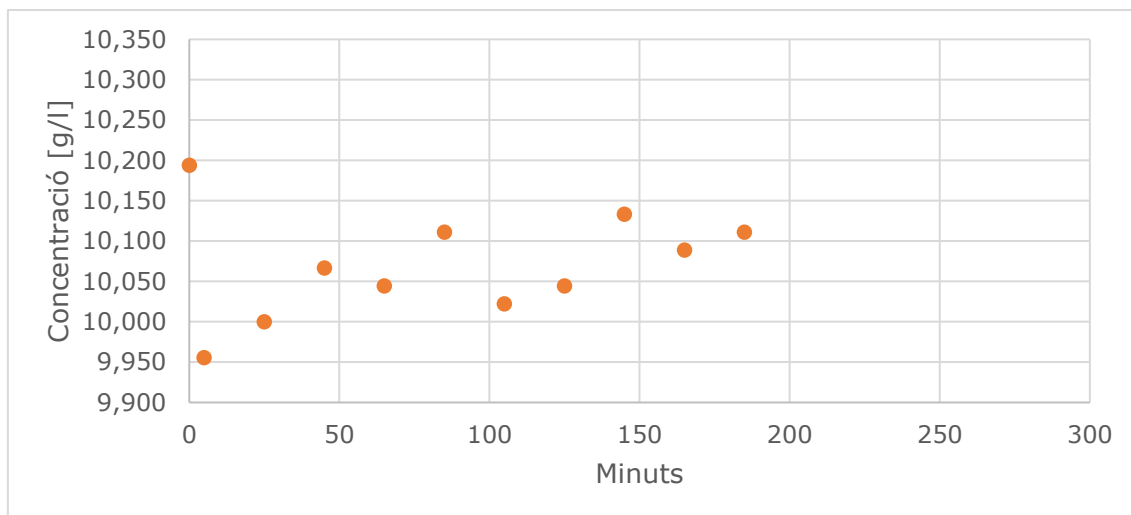


Figura 58. Gràfica que representa l'evolució de la concentració de glucosa per la fermentació de les càpsules 3C.

Es tornen a repetir uns resultats semblants als anteriors. La concentració de glucosa disminueix en els primers instants, però al cap de 24 hores és igual a la inicial.

En aquest cas, la velocitat de reacció pren aquests valors:

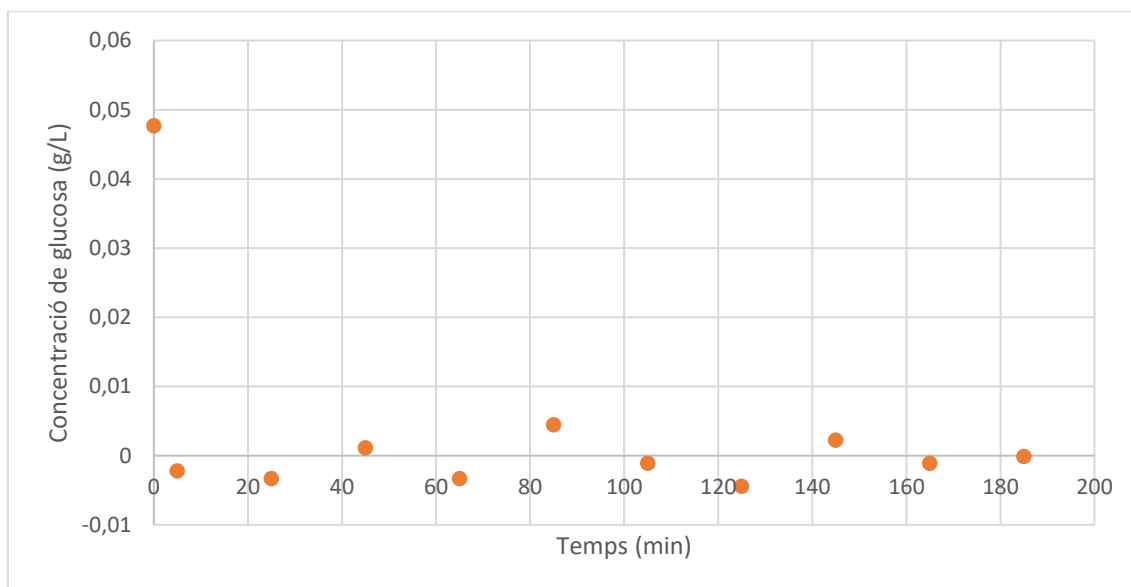


Figura 59. Gràfica de la velocitat de reacció de la càpsula 3C.

En aquest cas, s'observa un comportament similar a les càpsules 2C: una velocitat de reacció relativament elevada que cau ràpidament a valors aproximadament 0.

3.4.2.3 4C

Els resultats obtinguts per espectrofotometria són els següents:

Temps (min)	Absorbància	Concentració de glucosa (g/l)
1440	0,043	9,844
185	0,035	9,844
165	0,034	10,267
145	0,036	9,978
125	0,032	10,133
105	0,031	9,978
85	0,035	10,089
65	0,032	10,044
45	0,033	10,044
25	0,03	10,200
5	0,028	10,067
0	0,029	10,084

Taula 22. Lectures de l'absorbància de les mostres i la concentració calculada a partir de la recta de calibratge utilitzant les càpsules 4C.

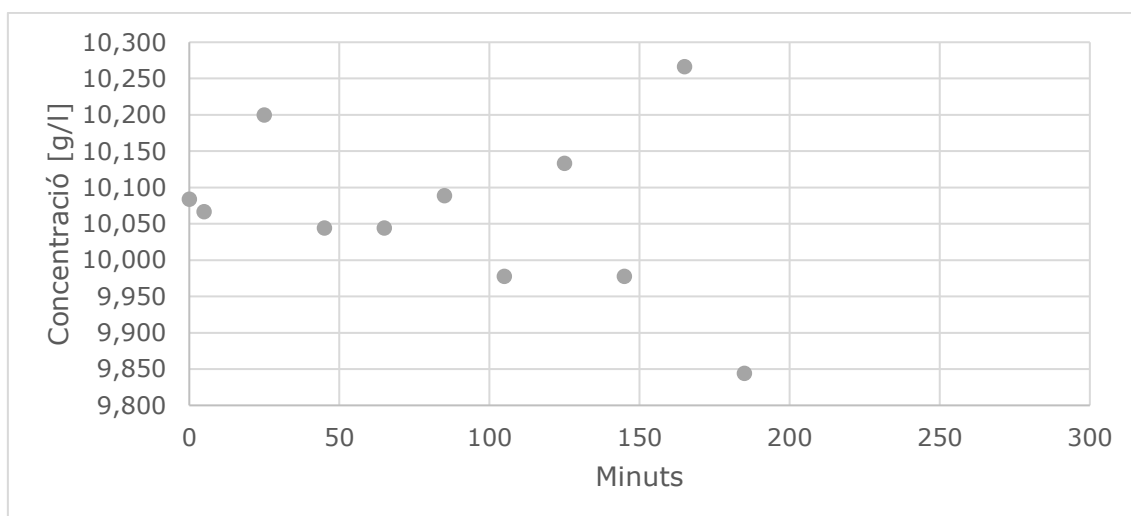


Figura 60. Gràfica que representa l'evolució de la concentració de glucosa per la fermentació de les càpsules 4C.

Aquest cas mostra una disminució de la glucosa que finalment acaba mantenint-se en el temps.

Finalment, en aquest cas la velocitat de reacció pren aquests valors:

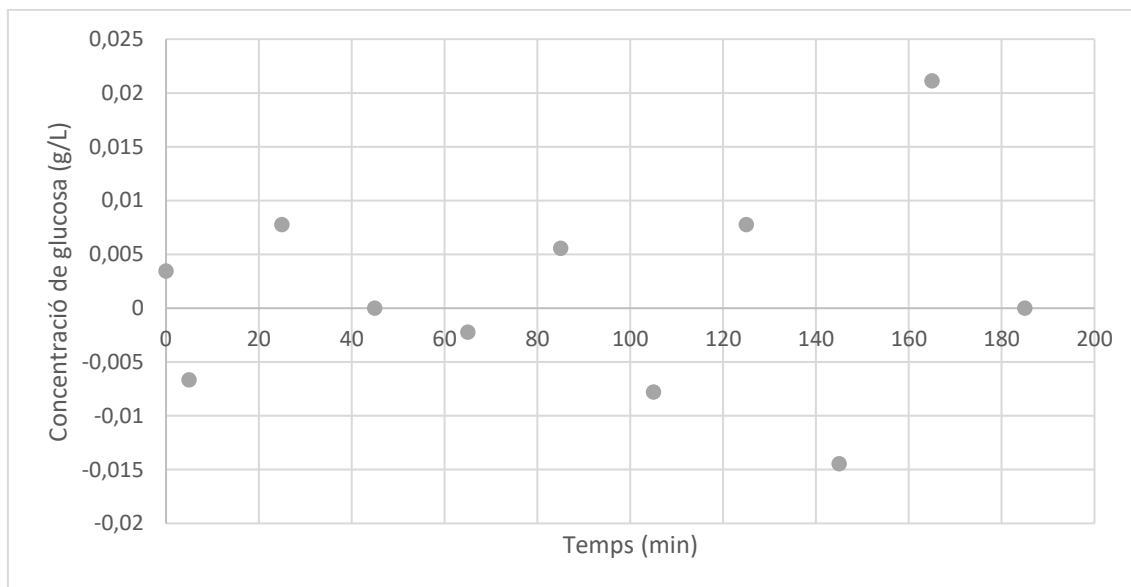


Figura 61. Gràfica de la velocitat de reacció de la càpsula 4C.

En aquest cas, no s'observa una velocitat de reacció inicial més elevada a les posteriors, sinó que la velocitat es manté constant al voltant de 0 des de l'inici. Al final, es pot observar que comença a augmentar.

3.4.3 Discussió de resultats

És evident, a partir dels resultats, que en els dos primers tipus de càpsules (2C i 3C), sobretot en la segona, la fermentació no ha tingut lloc. Les concentracions de glucosa inicials i finals en aquests dos casos són iguals.

El més probable és que la disminució inicial de glucosa sigui deguda a l'absorció de les càpsules d'aquesta durant els primers instants. Al cap

de 24 hores, però, la càpsula torna a alliberar la glucosa que havia absorbit sense que hagi arribat al llevat.

En el cas 4C, en canvi, veiem una disminució de la glucosa que es manté constant en el temps. Això és perquè encara no ha alliberat la glucosa sense fermentar de l'interior de la seva estructura. S'estaria donant lloc la fase 1 de la reacció de fermentació on el sucre es difon per l'estructura per arribar fins al llevat. Aquesta conclusió s'extreu a partir de comparar la tendència de la concentració de la glucosa amb la figura 26 i la figura 37: a la primera figura, s'observa que la concentració cau ràpidament ja que té lloc la fase 2 on la velocitat de fermentació és major. En canvi, a la segona figura, la concentració disminueix gradualment. De fet, si es comparen les tendències de la velocitat de fermentació de la figura 61 i la figura 38, s'observa que l'evolució inicial és similar i, per tant, la velocitat encara es troba a la fase 1.

Per tant, les càpsules 4C tindran major capacitat de degradació de sucres ja que és el tipus de càpsula que afavoreix més l'absorció dels sucres. Cal recordar que aquestes càpsules són les que tenen un contingut més alt de tensioactiu, lauril sulfat. Anteriorment, s'ha explicat com aquest tensioactiu és capaç de modificar l'estructura final de les càpsules i crea espais "buits" d'alginat. Aquesta és la causa darrera de l'augment de la capacitat d'absorció.

Al següent gràfic, es pot apreciar clarament aquesta diferència de comportaments entre els diferents tipus de càpsules: mentre les càpsules 2C (sense lauril sulfat) i 3C (2% de lauril sulfat) tenen un augment de la concentració de glucosa passades les 24 hores, en les càpsules 4C (10% de lauril sulfat) es manté estable en el temps.

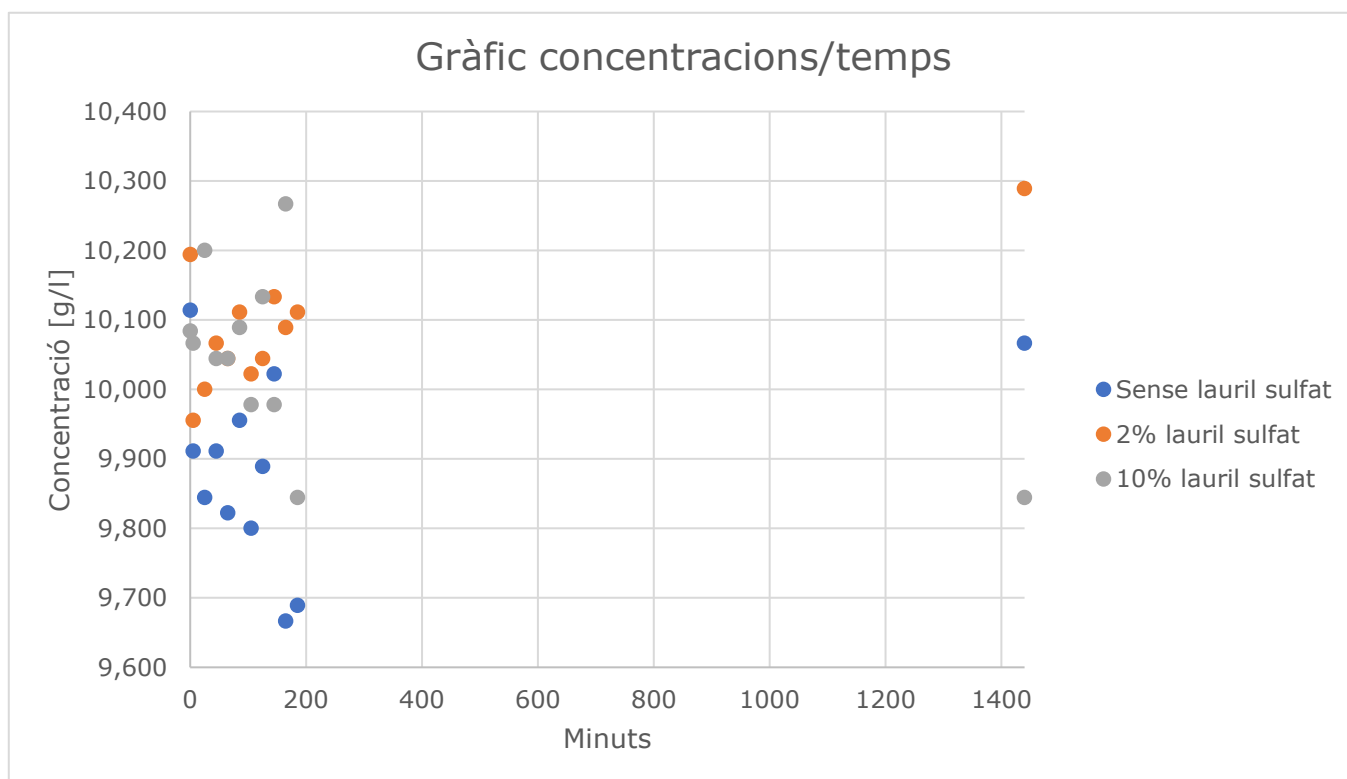


Figura 62. Gràfica de l'evolució de la concentració de la glucosa en els casos 2C, 3C i 4C.

4. Avaluació econòmica

A continuació es durà a terme una avaluació econòmica dels costos del projecte.

L'avaluació es farà desglossant els costos en funció de la seva naturalesa.

4.1 Costos de mà d'obra

Costos de mà d'obra			
Activitats	Temps dedicat (h)	Cost per hora (€/h)	Preu total (€)
A	120	15	1800
B	24	15	360
C	24	15	360
D	40	15	600
E	48	15	720
F	64	15	960
G	120	15	1800
H	496	15	7440
Cost total de mà d'obra			14040

Taula 23. Taula de costos de la mà d'obra.

4.2 Costos de reactius i materials

Producte	Reactiu	Consum reactiu (g)	Consum H ₂ O (mL)	C. unitari reactiu (€/g)	C. unitari H ₂ O (€/mL)	C. total reactiu (€)	C. total H ₂ O (€)	Cost total per producte (€)
Primer reactiu DNS	Àcid 3,5-dinitrosalílic	1,254	0	0,819	0,0005	1,03	0,00	11,51
	Tartrat sòdic potàssic	29,932	50	0,318	0,0005	9,54	0,03	
	Hidròxid de sodi	1,962	25	0,01326	0,0005	0,03	0,01	
	Glucosa	0,254	1765	0,0173	0,0005	0,00	0,88	
Segon reactiu DNS	Àcid 3,5-dinitrosalílic	1,265	0	0,819	0,0005	1,04	0,00	10,80
	Tartrat sòdic potàssic	30,432	50	0,318	0,0005	9,70	0,03	
	Hidròxid de sodi	2,147	25	0,01326	0,0005	0,03	0,01	
Fermentació sense encapsular	Llevat	5,004	500	0,0286	0,0005	0,14	0,25	0,48
	Glucosa	5,024	0	0,0173	0,0005	0,09	0,00	
Càpsules sense llevat	Alginat de sodi	4,996	500	0,014	0,0005	0,07	0,25	4,87
	Clorur de calci	37,772	1500	0,01964	0,0005	0,74	0,75	
	Lauril sulfat	4,949	0	0,00056	0,0005	0,00	0,00	
	Polietilenglicol	19,181	0	0,1593	0,0005	3,06	0,00	
Càpsules amb llevat	Alginat de sodi	2,42	250	0,014	0,0005	0,03	0,13	0,67
	Clorur de calci	6,42	250	0,01964	0,0005	0,13	0,13	
	Lauril sulfat	2,963	0	0,00056	0,0005	0,00	0,00	
	Llevat	9,04	0	0,0286	0,0005	0,26	0,00	
Fermentació de càpsules	Glucosa	15,196	1500	0,0173	0,0005	0,26	0,75	1,01
Analisi DNS	Aigua destil·lada	-	380	-	0,0005	-	0,19	0,19

Taula 24. Taula de costos dels reactius.

Cost total reactius (€)

29,54

4.3 Costos energètics

Taula 25. Taula de costos energètics

Costos energètics					
Equipament	Consum energètic (kW)	Temps d'ús (h)	KWh	Preu/kWh (€)	Cost total (€)
Agitador elèctric	0,050	192	9,600	0,160	1,54
Agitador magnètic	0,025	41	1,025	0,160	0,16
Agitador magnètic amb calefactor	0,040	15	0,600	0,160	0,10
Bany termostàtic	0,008	192	1,536	0,160	0,25
Espectrofotòmetre	0,190	30	5,700	0,160	0,91
Ordinador	0,065	550	35,750	0,160	5,72
Cost total energètic					8,67

4.4 Resum de costos

Resum de costos	
Cost total de mà d'obra	14040,00
Cost total de reactius	29,54
Cost total energètic	8,67
Cost total sense IVA	14078,21
IVA 21%	2956,42
Cost final	17034,63

Taula 26. Taula resum de costos del projecte.

5. Avaluació de l'impacte ambiental

Per avaluar l'impacte ambiental que aquest projecte té, es duu a terme la quantificació de quilograms de diòxid de carboni (CO_2) que s'han generat durant el seu desenvolupament i han sigut dispersats a l'atmosfera o considerant-los com a part del "*carbon footprint*".

D'altra banda, no s'avaluen els impactes que els reactius tenen en el medi ambient ja que aquests han estat tractats de forma específica en funció de les seves característiques: dipositats en contenidors especials que són gestionats externament per empreses de gestió de residus.

Per dur a terme la quantificació de kg de CO_2 , s'utilitza com a referència la documentació de l' "Oficina Española de cambio climático" [61]. Els diferents processos o activitats que aporten dades a aquesta comptabilització es divideixen en dos classes: directes (desplaçaments de vehicles) i indirectes (consum elèctric de les eines o materials utilitzats).

En el cas d'aquest projecte, es tenen en compte els quilograms aportats de forma indirecta ja que representen l'impacte i consum d'energia quantificable.

El factor d'impacte és igual a 0.38 kg CO_2 per kWh d'energia consumida [62]. Les dades de l'electricitat utilitzada durant el projecte han sigut analitzades a l'apartat d'"Avaluació econòmica".

Impacte ambiental			
Equipament	KWh	Factor d'impacte	kg CO ₂
Agitador elèctric	9,600	0,38	3,648
Agitador magnètic	1,025	0,38	0,390
Agitador magnètic amb calefactor	0,600	0,38	0,228
Bany termostàtic	1,536	0,38	0,584
Espectofotòmetre	5,700	0,38	2,166
Ordinador	35,750	0,38	13,585
kg CO ₂ totals			20,600

Taula 27. Taula de l'impacte ambiental del projecte.

6. Planificació

Per dur a terme aquest treball primerament es va dur a terme una classificació de les activitats necessàries per completar-lo. Posteriorment, es van organitzar en el temps en el diagrama de Gantt. Les activitats i la dedicació destinada a aquestes activitats ha sigut adaptada a la situació actual respecte la presentada al Project Charter.

6.1 Activitats

A. Recerca d'informació i pla experimental

Durant aquesta activitat es fa una recerca d'estudis previs sobre l'encapsulació amb alginat. També es busquen mètodes d'anàlisi de la concentració de la glucosa.

Tota la informació d'utilitat s'ha recopilat per al posterior ús en la memòria final.

B. Anàlisi DNS

Es posa en pràctica l'anàlisi seleccionada de la glucosa mitjançant el reactiu DNS. S'ha comprovat la linealitat del mètode i la seva confiabilitat per poder dur a terme les proves posteriors.

Un cop comprovat tot això, es produeix suficient reactiu per les següents proves i es fa la seva recta de calibratge.

C. Estudi de la recció del llevat i la glucosa

Es posa en marxa en un reactor la reacció convencional de fermentació del llevat i la glucosa amb els quals s'ha treballat durant

tot el projecte. S'han pres mostres de l'evolució de la reacció i s'han analitzat amb el mètode DNS. També, s'han analitzat els resultats per trobar la cinètica d'aquesta reacció.

D. Encapsulació sense llevat

Primer de tot, s'han provat diferents mètodes per a la creació de càpsules d'alginat. Un cop seleccionat el millor mètode, s'han provat diferents concentracions d'alginat per veure quines concentracions ofereixen millors prestacions i generen millors càpsules.

Un cop acabats aquest passos, s'ha treballat amb diferents tensioactius en diferents concentracions per analitzar els seus efectes en la encapsulació amb alginat.

E. Encapsulació de llevat

A partir de les dades aconseguides en l'apartat anterior, s'ha posat en pràctica l'encapsulació amb el microorganisme en l'interior de la càpsula. A partir de diferents dissolucions amb concentracions de llevat, alginat i tensioactiu diferents, s'ha buscat quina combinació dona les càpsules més estables.

F. Estudi de la reacció de la glucosa i el llevat ja encapsulat

S'ha seleccionat els tres tipus de càpsules més estables i s'ha realitzat un estudi de la reacció igual al realitzat al pas C amb cada tipus.

G. Estudi i recol·lecció de totes les dades experimentals

Es fa una comparació i estudi dels resultats obtinguts. S'analitza com la encapsulació ha afectat a la fermentació del llevat.

H. Redacció i posada en comú de tota la informació

Es fa una recol·lecció de tota la informació obtinguda, tan teòrica com experimental, i s'elabora la memòria final.

6.2 Diagrama de Gantt

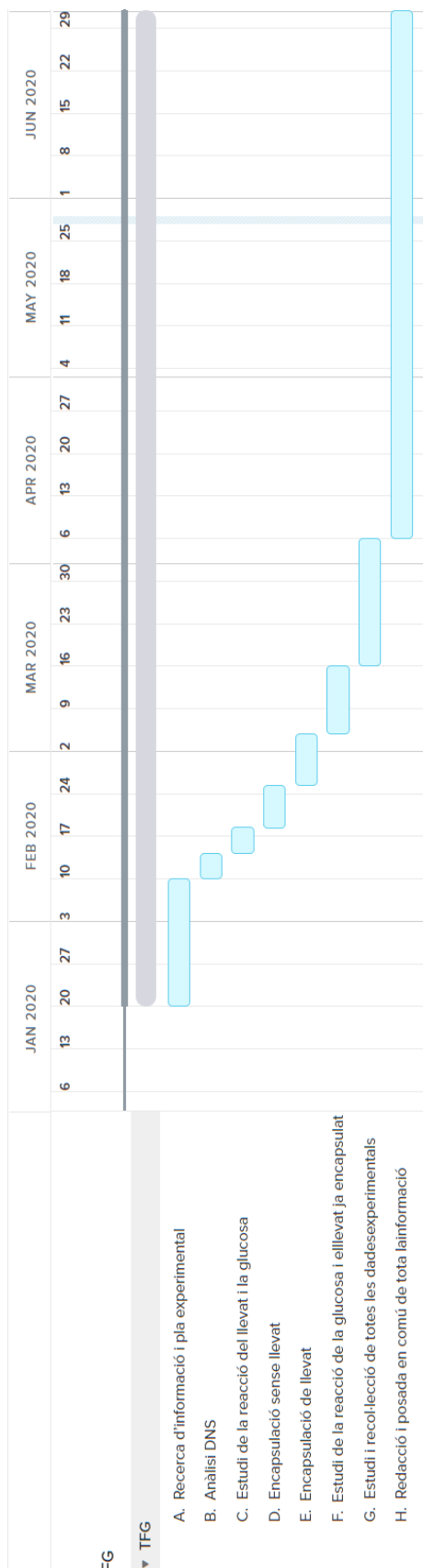


Figura 63. Diagrama de Gantt

6.3 Dedicació per activitats

A continuació, es mostra la dedicació destinada a cada activitat i quina proporció de temps ha ocupat en el desenvolupament del projecte:

	Data d'inici	Data de fi	Dies dedicats	Total d'hores
A	20/01/2020	07/02/2020	15	120
B	10/02/2020	12/02/2020	3	24
C	13/02/2020	17/02/2020	3	24
D	18/02/2020	24/02/2020	5	40
E	25/02/2020	03/03/2020	6	48
F	04/03/2020	13/03/2020	8	64
G	16/03/2020	03/04/2020	15	120
H	06/04/2020	30/06/2020	62	496
Total			117	936

Taula 28. Taula de la dedicació per activitat.

Els percentatges del temps destinat es mostren en el següent gràfic:

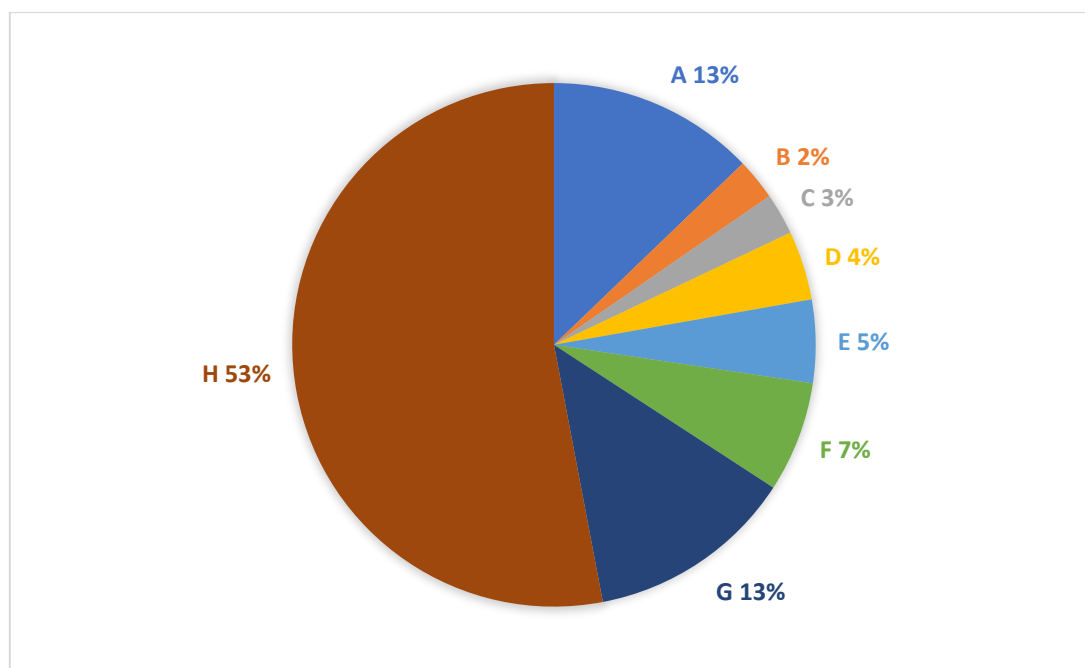


Figura 64. Gràfic de la dedicació de temps per activitat.

7. Conclusions

Per començar, el mètode d'anàlisi DNS ha sigut un mètode òptim per dur a terme els estudis de la concentració de glucosa en les solucions estudiades. Tot i l'existència de diferents mètodes per preparar aquest reactiu, el mètode elaborat per Nwogwugwu et al. [4] ha sigut l'utilitzat.

L'alginat ha demostrat ser un polímer capaç de gelificar en presència de Ca^{2+} i formar la matriu on el llevat ha sigut encapsulat. Tot i que en un inici es tenia la intenció d'utilitzar la tècnica d'emulsió per formar les microcàpsules, finalment la tècnica d'encapsulació utilitzada ha sigut l'extrusió. Aquest mètode ha resultat molt més simple, fàcil de preparar i efectiu. També, permet fer diferents modificacions en les tres dissolucions utilitzades (per exemple, l'addició de tensioactius a la solució d'alginat) sense comportar canvis en el rendiment de la producció de càpsules. Tot i així, ha sigut necessari utilitzar una xeringa de doble diàmetre per poder introduir el llevat dins de les càpsules d'alginat. A més, la mida final de les càpsules era macroscòpica. Així que, finalment, s'han obtingut càpsules de llevat, no microcàpsules.

Respecte a l'anàlisi de les diferents reaccions, s'ha comprovat que la reacció de fermentació de la glucosa a partir del llevat sense encapsular compost per *Saccharomyces cerevisiae* consta de 3 etapes que han sigut observades durant el desenvolupament de la part experimental (Fig. 38). En canvi, el llevat encapsulat ha tingut un comportament lleugerament diferent.

S'ha observat que les càpsules d'alginat pur no permeten la difusió de la glucosa fins als nuclis de llevat (inicialment hi ha una lleugera absorció de glucosa que, finalment, ha tornat a ser expulsada per la càpsula). A partir de l'addició de tensioactius, s'ha modificat

l'estructura gelificada de les càpsules augmentant la permeabilitat de la glucosa. És a dir, augmentant la concentració de tensioactius s'ha augmentat la difusió de la glucosa a l'interior de la càpsula. La causa és que el tensioactiu interfereix en la gelificació i provoca que quedin espais "buits" d'alginat.

En l'anàlisi de la reacció de fermentació de les càpsules 4C (càpsules amb major concentració de tensioactiu), s'ha observat la primera etapa de la reacció de fermentació en la qual la glucosa està sent difosa fins el llevat. Aquesta etapa té una evolució retardada respecte a la fase 1 de la fermentació amb el llevat sense encapsular. Per tant, gestionant la concentració de tensioactiu en les càpsules, es podria controlar l'evolució de la reacció.

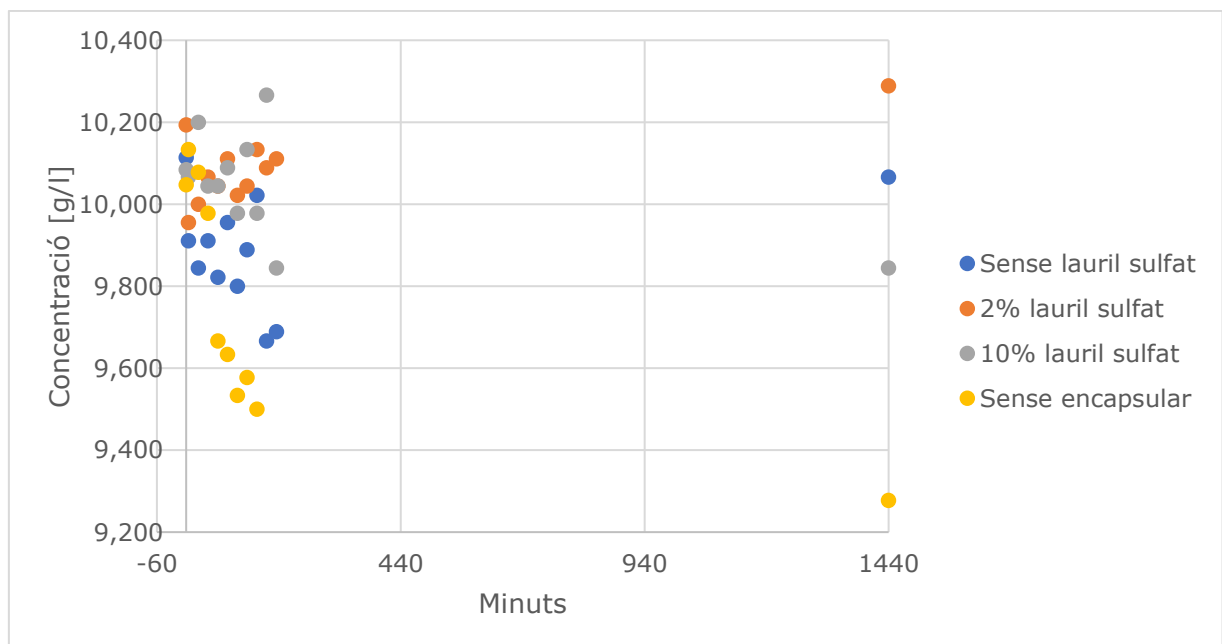


Figura 65. Gràfica que mostra l'evolució de la concentració del llevat al llarg de la reacció de fermentació per tots els casos estudiats.

Referències

- [1] B. Lupo Pasin, C. González Azón i A. Maestro Garriga, «Microencapsulació con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones,» *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos.*, vol. 1, núm. 3, pp. 130-151, 2012.
- [2] D. Bello Gil, E. Carrera Bocourt i Y. Díaz Maqueira, «Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico,» *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, vol. XL, núm. 2, pp. 45-50, 2006.
- [3] R. Bittman, «Analysis of reducing sugars in breakfast cereal and other foods. A general chemistry experiment.,» *Journal of Chemical Education*, vol. 51, núm. 1, p. 46, 1974.
- [4] A. A. Najmus Saqib i P. J. Whitney, «Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and disaccharide sugars,» *Biomass and Bioenergy*, vol. 25, núm. 11, pp. 4748-4750, 2011.
- [5] N. Nwogwugwu, G. Abu i O. Akaranta, «Reducing sugars from agro-waste biomass suitable for industrial applications,» *Archives of Applied Science Research*, vol. 8, núm. 8, pp. 37-40, 2016.
- [6] M. Garriga, M. Almaraz i A. Marchiaro, «Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible,» *Actas de Ingeniería*, vol. 3, pp. 173-179, 2017.
- [7] M. Iranz, «Carboxilo,» *mariairanzobiotec*, 5 Setembre 2016. [En línia]. Available: <https://www.mariairanzobiotec.com/glosario/carboxilo/>. [Últim accés: 10 Febrer 2020].

- [8] cynthialearnsthings, «DNS Assay,» BioEnergy Institute, 13 Juliol 2016. [En línia]. Available: <https://cynthialearnsthings.wordpress.com/2016/07/13/dns-assay/>. [Últim accés: 5 Febrer 2020].
- [9] The Editors of Encyclopaedia Britannica, «Glucose,» Encyclopedia Britannica , 20 Juliol 1998. [En línia]. Available: <https://www.britannica.com/science/glucose>. [Últim accés: 15 Febrer 2020].
- [10] Pubchem, «D-Glucose,» Pubchem, 20 Juny 2020. [En línia]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/GLUCOSE>. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [11] K. Pointer, «Glucose,» Healthline, 24 Març 2017. [En línia]. Available: <https://www.healthline.com/health/glucose>. [Últim accés: 4 Febrer 2020].
- [12] Pubchem, «3,5-Dinitrosalicylic acid,» Pubchem, 20 Juny 2020. [En línia]. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_5-Dinitrosalicylic-acid. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [13] N. Abril Díaz, J. A. Bárcena Ruiz, E. Fernández Reyes, A. Galván Cejudo, J. Jorrín Novo, J. Peinado Peinado, F. Toribio Meléndez-Valdés i I. Túnez Fiñana, *8. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*, Córdoba: Universidad de Córdoba, 2005.
- [14] jazmin, «Espectrofotometria,» Metrixlab, 28 Febrer 2015. [En línia]. Available: <https://www.metrixlab.mx/espectrofotometria/>. [Últim accés: 10 Juny 2020].
- [15] Jmgav, «¿Qué es un punto isobéptico y qué revela?,» Triplenlace, 29 Novembre 2020. [En línia]. Available:

- <https://triplenlace.com/2013/11/29/que-es-un-punto-isosbestico-en-espectroscopia-y-que-revela/>. [Últim accés: 5 Febrer 2020].
- [16] P. Burey, B. R. Bhandari, T. Howes i M. J. Gidley, «Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application,» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 5, núm. 48, pp. 361-377, 2008.
- [17] Pubchem, «Agar,» Pubchem, 21 Juny 2020. [En línia]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Agar>. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [18] S. G. Kumbar, C. T. Laurencin i M. Deng, «Chapter 1 - Polymer Synthesis and Processing,» de *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, Elsevier Science, 2014, pp. 1-31.
- [19] Cyber Colloids, «Introduction to Pectin - Structure,» Cyber Colloids, [En línia]. Available: <http://www.cybercolloids.net/information/technical-articles/introduction-pectin-structure>. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [20] F. Soares, «What is Pectin ?,» LinkedIn, 2 Octubre 2019. [En línia]. Available: <https://www.linkedin.com/pulse/what-pectin-filipe-soares/>. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [21] E. S. Gill, R. J. Spontak i S. M. Hudson, «Protein-based hydrogels utilizing beta-sheet conformation as cross-links: Characterization of thermal, rheological properties and temperature responsive protein release,» ACS, 11 Novembre 2004. [En línia]. Available: <https://acs.confex.com/acs/56serm/techprogram/P14226.HTM>. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [22] M. de Araujo Etchepare, J. Smaniota Barin, A. J. Cichosky, E. Jacob-Lopes, R. Wagner, L. L. Martins Fries i C. Ragagnin de

- Menezes, «Microencapsulation of probiotics using sodium alginate,» *Food Technology*, vol. 45, núm. 7, pp. 1319-1326, 2015.
- [23] T. Lopes da Silva, J. M. Martins Vidart, M. G. Carlos da Silva, M. Luiz Gimenes i M. G. Adeodato Vieira, «Alginate and Sericin: Environmental and Pharmaceutical Applications,» de *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*, IntechOpen, 2016.
- [24] N. Behary, A. Kerkeni, A. Perwuelz, P. Dhulster i n. e. Chihib, «Bioactivation of PET woven fabrics using alginate biopolymer and the bacteriocin nisin,» *Textile Research Journal*, vol. 11, núm. 83, pp. 1120-1129, 2013.
- [25] J. A. Rowley, G. Madlambayan i D. J. Mooney, «Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials,» *Biomaterials*, núm. 20, pp. 45-53, 1999.
- [26] G. A. Paredes-Juarez, M. Spasojevic, M. M. Faas i P. de Vos, «Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 2, 2014.
- [27] L. Sanguansri i M. Augustin, «Microencapsulation Methods. Physical Processes,» de *World Congress on Oils & Fats and 31st Lectureship Series*, Rosario, Argentina, 2015.
- [28] Capsulae, *Microencapsulation*, France.
- [29] Y. P. Timilsena, T. O. Akanbi, N. Khalid, B. Adhikari i C. J. Barrow, «Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 121, pp. 1276-1286, 2019.
- [30] N. Jyothi, S. N. Sakarkar, P. M. Prasanna, K. S. Prabha, P. S. Ramaiah i G. Srawan, «Microencapsulation techniques, factors

- influencing encapsulation efficiency,» *Journal of Microencapsulation*, vol. 3, núm. 27, pp. 187-197, 2010.
- [31] A. M. Bakry, S. Abbas, B. Ali, H. Majeed, M. Y. Abouelwafa, A. Mousa i L. Liang, «Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications,» *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 15, pp. 143-182, 2016.
- [32] Watson Inc., «Microencapsulation Technology,» Watson Inc., [En línia]. Available: <https://www.watson-inc.com/our-capabilities/microencapsulation/>. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [33] A. K. Anal i H. Singh, «Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery,» *Trends in Food Science and Technology*, vol. 18, núm. 5, pp. 240-251, 2007.
- [34] V. Chandramouli, K. Kailasapathy, P. Peiris i M. Jones, «An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions,» *Journal of Microbiological Methods*, vol. 56, núm. 1, pp. 27-35, 2004.
- [35] S.-J. Kim, S. YongCho, S. H. Kim, O.-J. Song, I.-S. Shin, D. S. Chaa i H. J. Parke, «Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121,» *LWT - Food Science and Technology*, vol. 41, pp. 493-500, 2008.
- [36] B. Ozer, H. Kirmaci, E. Şenel, M. Atamer i A. Hayaloglu, «Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white- brined,» *International Dairy Journal*, vol. 19, núm. 1, pp. 22-29, 2009.
- [37] A. Homayouni, «Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of

- synbiotic ice cream,» *Food Chemistry*, vol. 111, núm. 1, pp. 50-55, 2008.
- [38] H. Mirzaei, H. Pourjafar i A. Homayouni, «Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese,» *Food Chemistry*, vol. 132, pp. 1966-1970, 2012.
- [39] W. Krasaekoopt i S. Watcharapoka, «Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice,» *LWT - Food Science and Technology*, vol. 57, pp. 761-766, 2014.
- [40] The Grittygatorr, «Olive Oil Sphere, Masala Papad.,» The Grittygatorr, 21 Maig 2016. [En línia]. Available: <https://grittygatorr.wordpress.com/2016/05/21/olive-oil-sphere-masala-papad/>. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [41] M. E. Raffino, «Levadura,» Concepto de, 15 Novembre 2018. [En línia]. Available: <https://concepto.de/levadura/#ixzz6NBSXtFWw>. [Últim accés: 15 Febrer 2020].
- [42] L. Moreno Buj, «Una levadura que transformará la enología. Bodegas Murviedro, Valencia,» Global Stylus, 4 Juny 2013. [En línia]. Available: <https://globalstylus.com/una-levadura-que-transformara-la-enologia-bodegas-murviedro-valencia/>. [Últim accés: 22 Maig 2020].
- [43] J. A. Mejía Barajas i A. Saavedra Molina, «Conociendo la levaduras,» Saber más, 11 Març 2016. [En línia]. Available: <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/97-numero-131/193-conociendo-las-levaduras.html>. [Últim accés: 7 Febrer 2020].

- [44] Levital, «Los diferentes tipos de levadura,» Levital Blogs, [En línia]. Available: <https://levital.blog/los-diferentes-tipos-de-levadura/>. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [45] R. Ruiz, «Fementación alcohólica,» Kami de Deus, 1 Agosto 2019. [En línia]. Available: <https://www.kamidedeus.com/blog/2019/08/01/fermentacion-alcoholica>. [Últim accés: 8 Febrer 2020].
- [46] Khan Academy, «Fermentación y respiración anaeróbica,» Khan Academy, 15 Octubre 2019. [En línia]. Available: <https://es.khanacademy.org/science/biology/cellular-respiration-and-fermentation/variaciones-on-cellular-respiration/a/fermentation-and-anaerobic-respiration>. [Últim accés: 20 Març 2020].
- [47] S. C. Oliveira, D. P. Stremel, E. C. Dechechi i F. M. Pereira, «Kinetic Modeling of 1-G Ethanol Fermentations,» de *Fermentation Processes*, InechOpen, 2017.
- [48] R. H. Hopkins i R. H. Roberts, «The kinetics of alcoholic fermentation of sugars by brewer's yeast,» *Biochem J.*, vol. 4, núm. 29, pp. 919-930, 1935.
- [49] A. Zinnai, F. Venturi, C. Sanmartin i G. Andrich, «The Kinetics of Alcoholic Fermentation by Two Yeast Strains in High Sugar Concentration Media,» *JOURNAL OF BIOPROCESSING & BIOTECHNIQUES.*, vol. 3, núm. 10, 2013.
- [50] Ecured, «Fermentación Alcohólica,» Ecured, 10 Novembre 2014. [En línia]. Available: https://www.ecured.cu/Fermentaci%C3%B3n_alcoh%C3%B3lica. [Últim accés: 14 Maig 2020].
- [51] Q. Collado, «Fermentació Alcohólica (II),» Verema, 27 Novembre 2001. [En línia]. Available:

- <https://www.verema.com/blog/verema/500449-levaduras-fermentacion-alcoholica-ii>. [Últim accés: 10 Febrer 2020].
- [52] R. I. Viramontes Álvarez i R. Pérez Leal, «Levaduras vínicas,» *Acenologia*, 28 Febrer 2014. [En línia]. Available: http://www.acenologia.com/correspondencia/levaduras_vinicas_cor0214.htm. [Últim accés: 22 Febrer 2020].
- [53] «Sal de Seignette,» Wikipedia, [En línia]. Available: https://es.wikipedia.org/wiki/Sal_de_Seignette. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [54] «Tensión superficial,» [En línia]. Available: https://fsz.ifas.ufl.edu/surfacetensionandcapillarity/html/tensioactivos.htm#noionicos_display. [Últim accés: 17 Febrer 2020].
- [55] Idun Nature, «¿Qué son los tensioactivos?,» Idun Nature, 9 Novembre 2013. [En línia]. Available: <https://www.idun-nature.com/blog/archivos/tag/tensioactivos-no-ionicos/>. [Últim accés: 17 Febrer 2020].
- [56] Quimica Alkano, «Lauril Sulfato de Sodio Polvo,» Quimica Alkano, [En línia]. Available: <http://quimicaalkano.com/product/lauril-sulfato-de-sodio-polvo/>. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [57] Santa Cruz Biotechnology, «PEG 6000 (CAS 25322-68-3),» Santa Cruz Biotechnology, [En línia]. Available: <https://www.scbt.com/es/p/peg-6000-25322-68-3>. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [58] «Jeringa 10 mL 3 cuerpos,» [En línia]. Available: <https://www.mascotasysemillas.com/es/accesorios/877-jeringa-10-ml.html>. [Últim accés: 22 Juny 2020].
- [59] «Jeringa desechable 10 ml,» [En línia]. Available: <https://insumosalud.cl/producto/jeringa-desechable-10-ml/>. [Últim accés: 22 Juny 2020].

- [60] M. Taha, W. Nasser, A. Ardakani i H. Alkhatib, «Sodium lauryl sulfate impedes drug release from zinc-crosslinked alginate beads: switching from enteric coating release into biphasic profiles,» *Int J Pharm*, Vol. 350 de 21-2, núm. 350, pp. 291-300, 2008.
- [61] M. d. a. a. y. m. a. Oficina Española de Cambio Climático, Guía para el calculo de la huella de carbono y para la elaboración de un plan de mejora de una organización., Madrid, 2017.
- [62] CNMC (Comisión Nacional de los Mercados y la Competencia, MixComerc y factores impacto, 2018.